

**A melanoma lehetséges terápiás célpontjainak vizsgálata: az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal gátlása és a melanoma sejtek termelte exoszómák immunmoduláló hatásának vizsgálata**

Ph.D. értekezés

**Marton Annamária**

**Témavezetők**

**Vizler Csaba, Ph.D.**  
tudományos főmunkatárs

**Buzás Krisztina, Ph.D.**  
tudományos munkatárs

**Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar**

**Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biokémiai Intézet**

**Szeged  
2016**

# 1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék .....	2
2.	Rövidítések jegyzéke .....	4
3.	Bevezetés és irodalmi áttekintés .....	8
3.1	A rosszindulatú daganatok kialakulása .....	8
3.2	A daganatok kemoterápiája .....	8
3.3	A daganatos mikrokörnyezet .....	9
3.3.1	Természetes ölősejtek .....	11
3.3.2	T limfociták .....	11
3.3.3	Makrofágok .....	13
3.4	A melanoma .....	17
3.5	A melanoma terápiája .....	19
3.6	A nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) .....	20
3.6.1	Az NF-kappa B aktivitás szerepe a daganatképzésben és a kemoterápiás szerek elleni rezisztenciában. ....	22
3.6.2	A nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) és a melanoma .....	23
3.6.3	NF-kappaB gátlószerek feltételezett szerepe a tumor terápiában.....	23
3.7	A vanillin (metil-vanillin; 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehid) .....	26
3.8	Az exoszómák .....	28
3.8.1	Az exoszómák szerepe a gazda-tumor kommunikációban .....	31
4.	Célkitűzések .....	33
5.	Anyagok és módszerek .....	34
5.1	Vegyszerek .....	34
5.2	Sejtkultúrák és sejtvonalak .....	34
5.2.1	A375 humán melanoma sejtvonal .....	34
5.2.2	B16F1 egér melanoma sejtvonal .....	35
5.2.3	Raw 264.7 és Raw264.7/NF- $\kappa$ B-Luc. egér makrofág sejtvonal.....	35
5.2.4	Primér dendritikus sejtek és CD4 <sup>+</sup> T sejtek .....	35
5.3	Luciferáz esszé .....	36
5.4	Sejtosztódási esszé .....	37
5.5	Exoszómák izolálása .....	37
5.6	Az exoszómák strukturális vizsgálata .....	37
5.7	Az exoszómák fehérjetartalmának meghatározása .....	38
5.8	Citokinek és kemokinek detektálása „proteome profiler” segítségével.....	38
5.9	Állatok és állatkísérletek .....	38

5.10	Toxikológiai vizsgálat.....	38
5.11	A375 xenograft modell .....	39
5.12	Statisztikai analízis .....	40
6.	Eredmények.....	41
6.1	A kiválasztott vanillin analógok gátolják az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal aktivitását és az A375 humán melanoma sejtek proliferációját.....	41
6.2	Az <i>ortho</i> -vanillin és 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid (TBA) terápiás hatással rendelkezik az A375 humán melanoma egér xenograftok esetében.....	45
6.3	A B16 melanoma sejtek exoszómáinak jellemzése .....	47
6.4	A melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák a dendritikus sejtek aktivációján keresztül T sejt proliferációt idéznek elő.....	48
6.5	A B16F1 melanomából származó exoszómák aktiválják a makrofágok NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalát .....	49
6.6	A melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák megváltoztatják a makrofágok citokin és kemokin mintázatát .....	49
7.	Megbeszélés.....	51
8.	Irodalomjegyzék .....	56
9.	Összefoglalás .....	67
10.	Summary.....	72
11.	Köszönetnyilvánítás .....	76
12.	Tudományos közlemények listája .....	78

## 2. Rövidítések jegyzéke

4-HC	4-hydroperoxycyclophosphamide (4-hidroperoxi-ciklofoszfamidot)
AP1	Activator protein 1 (Aktiváló fehérje 1)
APC	Antigen-presenting cell (Antigén prezentáló sejt)
Bcl-2	B-cell lymphoma-2protein (B sejtes limfóma 2 fehérje)
BMDC	Bone marrow-derived cell (Csontvelő eredetű sejt)
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene (B-Raf proto-onkogén)
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand (Kemokin (C-C motívum) ligand 2
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein (Celluláris apoptózist gátló fehérje)
COX-2	Cyclooxygenase-2 (ciklooxygenáz-2)
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (Citotoxikus T limfocita)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (citotoxikus T-limfocita antigén 4)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Kemokin (C-X-C motívum) ligand)
CSF-1	Colony stimulating factor 1 (Kolónia stimuláló faktor-1)
DC	Dendritic cell (Dendritikus sejt)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (Dulbecco foszfát puffer)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermális növekedési faktor)
EGFRIIIv	Epidermal Growth Factor Receptor variant III (Epidermális növekedési faktor receptor variáns III)
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule (Epiteliális sejtadhéziós molekula)
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport (Szállításához szükséges endoszómális válogató komplex)
FACS	Flow cytofluorometry (Áramlési citofluorimetria)
Fas	Fas receptor, CD95 (Tumor nekrosis faktor családba tartozó transzmembrán fehérje)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötális borjú savó)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblaszt növekedési faktor)

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor)
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor (Humán epidermális növekedési faktor receptor)
HSP	Heat shock proteins (Hőshock fehérjék)
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins (Apoptózist gátló proteinek)
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1 (Intracelluláris sejtadhéziós molekula-1)
IDO	Indoleamine dioxygenase (Indolamin-dioxigenáz)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IKK	Inhibitor kappa B kinase (Inhibítor kappa B-kináz)
IL-	Interleukin-
I $\kappa$ B	Inhibitor kappa B (Inhibítor kappa B)
KRAS	V-Ki-ras2 Kristen rat sarcoma viral oncogene (V-Ki-ras2 Kristen patkány virális onkogén)
LPS	Lipopolysaccharide (Lipopoliszacharid)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogén aktiválta protein kináz)
Mart-1	Melanoma antigene recognized by T cell (Melanoma antigén 1)
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor (Makrofág kolónia-stimuláló faktor)
MDR1	Multidrug Resistent Protein 1 (Multidrog rezisztens fehérje 1)
MDSC	Myeloid-derived supressor cell (Mieloid eredetű szupresszor sejt)
MHC	Major histocompatibility complex (Fő hisztokompatibilitási komplex)
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1 (Makrofág gyulladásos fehérje-1)
miRNS	mikro RNS
ML-IAP	Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein (Melanoma apoptózist gátló fehérje)
MMP	Matrix Metalloproteinase (Mátrix metalloproteináz)
MSC	Mesenchymal stem cell (Mesenchimális őssejt)
MVB	Multivesicular bodies (Multivezikuláris testek)
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (Mieloid differenciációs elsődleges válasz gén 88)

NBD	NEMO-binding domain (NEMO-kötő domén)
NEMO	Inhibitor kappa B kinase $\gamma$ (IKK $\gamma$ , inhibítor kappa B-kináz)
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Nucleáris faktor kappa B)
NK	Natural killer cell (Természetes ölő sejt)
NKT	Natural killer T cell (Természetes ölő T sejt)
NSG	NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ immunodeficiens egér
PBS	Phosphate Buffered Saline (foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat)
PD1	Programmed cell death protein 1 (Programozott sejthalál fehérje 1)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Vérlemezke eredetű növekedési faktor)
pEGFP	Plasmid encoding enhanced green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérjét kódoló plazmid)
PS-341	proteoszóma inhibitor (Bortezomib, VELCADE)
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (chemokine ligand 5)
RGF	Radial Growth Phase (Sugárirányú növekvő stádium)
SCID	Severe combined immunodeficiency (Súlyos kombinált immunhiány)
TAM	Tumor-associated macrophage (Tumor asszociált makrofág)
TBA	2,4,6-trihydroxybenzaldehyde (2,4,6-trihidroxibenzaldehidet)
TCR	T cell receptor (T sejt receptor)
TEM	Transmission electron microscopy (Transzmissziós elektronmikroszkópiát)
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$ (transzformáló növekedési faktor- $\beta$ )
Th	T helper cell (Segítő T sejt)
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (Szöveti mátrix metalloproteináz 1 inhibitor)
TLR4	Toll-Like receptor 4 (Toll szerű receptor 4)
TNFR-	Tumor Necrosis Factor Receptor- (Tumor nekrosis faktor receptor-)
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha (Tumor Nekrosis Faktor-alfa)
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1 (TNF receptor asszociált faktor 1)
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2 (TNF receptor asszociált faktor 1)

TRAIL/APO2	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TNF-hez hasonló apoptózist indukáló ligand)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (Vaszkuláris sejtadhéziós molekula)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)
VGF	Vertical Growth Phase (Vertikális növekedési stádium)
XTT	Cell Proliferation Assay (Sejtproliferációs esszé)

### **3. Bevezetés és irodalmi áttekintés**

#### **3.1 A rosszindulatú daganatok kialakulása**

A rosszindulatú daganatok kialakulásához a ma elfogadott modell szerint számos genetikai változás vezet. A rosszindulatú daganatokat számos tulajdonságuk különbözteti meg a normál szövetektől: a növekedési faktoroktól való függetlenedés, a kontakt gátlás megszűnése, a programozott sejthalál hibás működése, a genetikai stabilitás elvesztése, az angiogenezis, invázióra és áttétképzésre való képesség (Hanahan and Weinberg 2000). Mivel a malignus állapot kialakulásához számos genetikai elváltozás szükséges, a daganatok előbb-utóbb óhatatlanul az immunrendszer „látókörébe” kerülnek, ezért túlélésükhöz az immunválasz modulálására van szükség (Turley, Cremasco et al. 2015). A daganatos szövetet nem csak malignus sejtek építik fel; a daganatok vázát kötőszövet alkotja, 1 mm<sup>3</sup> méret felett erekkel is rendelkeznek, és mai tudásunk szerint kialakulásukban a malignus mikroökönyezet által „átprogramozott” immunsejtek is szerepet játszanak. Mindezek miatt a rosszindulatú daganatok kialakulásának alapvető eleme a tumor-gazda kommunikáció.

#### **3.2 A daganatok kemoterápiája**

A daganatterápiában, ami eredetileg sebészeti eljárásokra és radioterápiára korlátozódott, az 1950-es évektől megjelent a kemoterápia, ami a daganatos betegségek leküzdésének egyik legfontosabb eszközévé lépett elő. Használható sebészeti beavatkozás vagy radioterápiás kezelés kiegészítőjeként, ilyenkor adjuváns terápiáról beszélünk; vagy önmagában alkalmazva, neoadjuváns terápia formájában.

A kemoterápiás szerek listája egyre bővül. Ma már több családból tevődnék össze; ilyenek az alkiláló szerek, antimetabolitok, topoizomeráz-gátlók, mikrotubulus polimerizáció- és depolimerizáció-gátlók, DNS-be interkalálódó szerek, platinaszármazékok. A kemoterápiás szereket főleg kombinációs terápia formájában használják (DeVita and Chu 2008).

A kemoterápia hatékonysága az egyes tumortípusoktól függően változó. Vannak olyan gyakori tumortípusok, ahol a kezelés hatékonysága minimális, ilyenek például az áttétes prosztata-karcinoma vagy a melanoma. Hatékonyságtól függetlenül igaz viszont a kemoterápiára, hogy súlyos, főleg a gyorsan osztódó szöveteket érintő mellékhatásokkal jár. További probléma, hogy az inherensen genetikailag instabil tumorsejtek képesek lehetnek



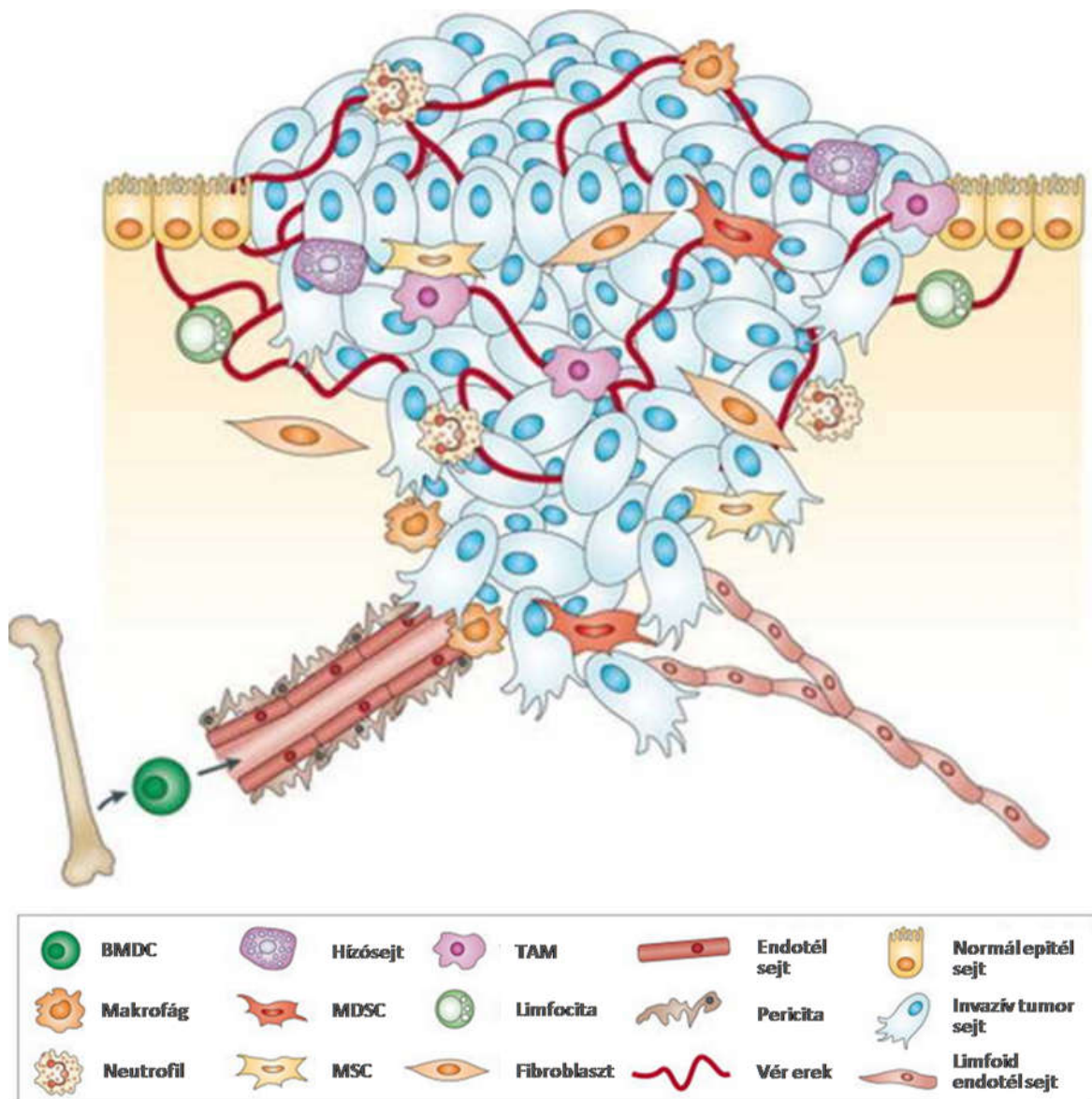
„kibújni” a szelekciós nyomás alól; rezisztensé válhatnak a konvencionális kezelésekre. Mivel a daganatok végső eliminálásában az immunrendszer is szerepet játszik, a kemoterápia immunszuppresszív hatása is hátrányos lehet.

Mindezek miatt igen hasznos lenne olyan hatóanyagokat találni, amelyek a ma is használt, viszonylag jól ismert daganatellenes szerek hatékonyságát növelnék. Munkám egyik része ezt célozza, mégpedig egy jól ismert fűszeralapanyag, a vanillin, és rokon aldehidek daganatellenes hatásának vizsgálatával.

A vizsgálatokat egy igen széles körben használt és viszonylag könnyen kezelhető daganatellenes szerrel, doxorubicinnel (adriamicin) kezdtük, amely a DNS-be integrálódó szer. Később áttértünk egy melanoma kemoterápiás kombinációban is használt szerre, az alkiláló ciklofoszfamidra.

### **3.3 A daganatos mikrokörnyezet**

A folyamatos biológiai, kémiai és fizikai karcinogén hatások ellenére daganatok csak ritkán alakulnak ki szervezetünkben. Ennek az egyik oka, hogy az immunrendszer folyamatos ellenőrzés alatt tartja a testünk sejtjeit. Virchow már az 1800-as években leírta a leukocita infiltrációt a szolid tumorokba, azonban az immunsejtek változatos szerepét a daganatok kialakulásában és fejlődésében csak mostanában kezdjük megérteni. A daganatok kialakulása, fejlődése és az immunrendszer általi eliminálása (immune surveillance) egy dinamikus folyamat (Dunn, Old et al. 2004). Mára egyértelművé vált, hogy a daganatos mikrokörnyezet igen komplex és heterogén. A daganatok a tumor sejtek mellett sztróma sejtek sokaságából tevődnek össze (Tlsty and Coussens 2006). A sztróma sejtek közé tartoznak például az endotél sejtek, periciták, fibroblasztok, mezenchimális őssejteket (MSC, Mesenchymal stem cell) és különböző csontvelő-eredetű sejtek (BMDC, Bone Marrow-derived Cells) beleértve a makrofágokat, neutrofil granulocitákat, hízósejteket, mieloid eredetű szupresszor sejteket (MDSC, Myeloid-derived suppressor cell), limfocitákat (1. ábra).



**1. ábra: A primér tumor mikrokörnyezete.** A primér tumorban található daganatos sejtek mellett számos egyéb sztróma sejt is megtalálható. Ilyen sejtek például a periciták, az endotél sejtek, fibroblasztok, mezenchimális őssejtek (MSC), és a különböző csontvelő-eredetű sejtek (BMDC), mint makrofágok (tumor asszociált makrofágok, TAM), neutrofil granulociták, hízósejtek, mieloid eredetű szupresszor sejtek (MDSC) és limfociták (Joyce and Pollard 2009).

Immunológiai szempontból a daganatsejtek, a bennük végbemenő genetikai és epigenetikai változások miatt megkülönböztethetőek lehetnek az egészséges sejtektől. A genetikai változásokkal járó új antigének megjelenése az adaptív immunrendszert, míg a konzervált stresszmarkerek a veleszületett immunrendszert aktiválhatják.

### **3.3.1 Természetes ölősejtek**

A daganatok korai felismerésében a veleszületett immunrendszernek van elsődleges szerepe. A természetes ölősejteknek (NK sejtek, Natural Killer cells) fontos szerepet tulajdonítanak ebben a folyamatban (Smyth, Crowe et al. 2001). Az NK sejtek aktivációját eredményezi a tumor sejteken nem megfelelő mértékű, vagy hiányzó fő hisztokompatibilitási komplex I (MHC-I, major histocompatibility complex) expresszió. Az MHC-I által közvetített gátló szignál hiányában az NK sejtek aktiválódnak, és rövid időn belül elpusztítják a daganatos sejteket. Az MHC-I hiányon kívül a stresszfehérjék, például a számos daganat által túltermelt hősokk fehérje 70 (HSP70, heat shock protein 70) is képesek az NK sejtek aktiválására (Juhasz, Lipp et al. 2013). A citotoxicitásban granzim és perforin exocitózisa és halálreceptorok (TRAILR, Fas) is részt vesznek. Azáltal, hogy az NK sejtek interferon-gammát (IFN- $\gamma$ ) is termelnek, immunreguláló szerepük is van: fokozzák a makrofágok ölképességét és aktiválják az adaptív immunrendszerhez tartozó dendritikus sejteket (DC) és citotoxikus T sejteket. Azonban az NK sejtek egy csoportja citotoxikus lehet az aktivált CD8<sup>+</sup> T limfocitákra és dendritikus sejtekre is, ezáltal csökkentve a CD8-mediálta tumorellenes választ (Rabinovich, Li et al. 2003, Hayakawa, Screpanti et al. 2004). Ez a mechanizmus valószínűleg egy „kisiklott” fiziológiás negatív feedback mechanizmus eredménye.

### **3.3.2 T limfociták**

A CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T sejtek az adaptív immunitás fő helper és effektor sejtjei. Míg a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T sejtek tumorellenes hatása jól definiált, a CD4<sup>+</sup> T sejtek paradox módon viselkedhetnek a tumoros mikrokörnyezetben. Amíg vastagbél és tüdő daganat esetében a CD4<sup>+</sup> T sejt infiltráció kedvező prognózis mutat, addig az emlő és vese tumoros folyamatokban csökkenti a túlélési esélyeket (Wakabayashi, Yamazaki et al. 2003, DeNardo, Johansson et al. 2008). A Th sejteket korábban két csoportra osztották. Az egyiket az IFN- $\gamma$ , tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-12 és IL-2 expresszáló Th1-es sejtek alkotják. A citokinek hatására a Th1 sejtek regulálják az immunrendszer felügyeletét azáltal, hogy fokozzák az antigén prezentáló sejtek (APC) antigén feldolgozását és prezentálását az MHC molekulán, ezáltal CD8<sup>+</sup> T sejt aktivációt váltva ki. Az antigén-specifikus aktivációt követően a Th1 sejtek képesek elpusztítani a daganatos sejteket a

magas IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  és citolitikus granulumok kibocsátásával. Így tehát a Th1-es válasz direkt és indirekt módon is képes befolyásolni a tumor ellenes választ.

A másik csoportba az IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 és IL-13-at termelő Th2-es T sejtek tartoznak. A Th2 sejtek megváltoztatják az adaptív immunitást azáltal, hogy T sejt anergiát váltanak ki, megakadályozzák a T sejt mediálta citotoxicitást és elősegítik a B sejtek által vezérelt humorális immunválaszt. Ma már tudjuk, hogy ezen a két csoporton kívül több különböző altípusú Th sejt létezik. Ilyenek például a follikuláris T helper sejtek (T<sub>FH</sub>), az IL-17-et expresszáló Th sejtek (Th17) és a regulátoros T sejtek (T<sub>reg</sub>) (Wilson, Rowell et al. 2009). Ezzel párhuzamosan az egyes, kettes, 17-es (T<sub>C1</sub>, T<sub>C2</sub>, T<sub>C17</sub>) és a regulátoros CD8<sup>+</sup> T sejtek alpopulációit is leírták (Croft, Carter et al. 1994, Lu and Cantor 2008).

A CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T sejteken kívül létezik két olyan sejtpopuláció, amelyek citokinek hatására, vagy a TCR-en keresztül aktiválódnak. A természetes ölő T sejtek (NKT) glikolipideket ismernek fel a nem-klasszikus MHC molekulán (CD1b) (Godfrey and Berzins 2007), míg a  $\gamma/\delta$  T sejtek sokféle molekulát felismernek, de nem korlátozódik az MHC-n való bemutatására (Carding and Egan 2002). A  $\gamma/\delta$  T sejtek citotoxikusak, míg az NKT sejtek elsősorban citokin termelésük révén járulnak hozzá a daganatok eliminálásához.

Az összes T limfocita alcsoport tumoros folyamatokban betöltött szerepe és a tumorelles hatása intenzíven kutatott (Ruffell, DeNardo et al. 2010).

Klasszikus kutatások kimutatták, hogy IL-12 és IFN $\gamma$  hatására a Th1sejtek IFN $\gamma$ -t termelve hozzájárulnak a citotoxikus CD8<sup>+</sup> T sejtek differenciálódásához és osztódásához, amelyek citotoxikusak a tumor sejtek számára (Sharma, Zhu et al. 2005). Ezzel ellentétben a Th2 sejtek transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) hatására a CD4<sup>+</sup> T sejtek regulátoros sejtekké alakulnak, amelyek támogatják a tumor immunitását a CD8<sup>+</sup> T sejtek aktivációjának gátlásán keresztül (Zou 2006). *In vitro* körülmények között a Th2 CD4<sup>+</sup> T sejtek megakadályozzák az emlő karcinoma sejtek apoptózist, míg *in vivo* IL-4 termelésén keresztül támogatják a tumor növekedését (DeNardo, Barreto et al. 2009).

Az IL-12-vel ellentétben az IL-23 elősegíti a tumoros folyamatokat. IL-23 nem csak a neutrofil granulociták és a makrofágok tumorba való beszűrődését befolyásolja, hanem fokozza az angiogenezis kialakulását és a gyulladásos mediátorok termelődését is a tumoros mikro környezetben. Az IL-23 antagonizálja az IL-12 és IFN- $\gamma$  hatását, amely citokinek elengedhetetlenek a citotoxikus immunválasz és a tumor ellenes limfociták aktiválásához (Langowski, Kastelein et al. 2007).

A Th17-es sejtek jelenlétét kimutatták petefészek, prosztata és hepatocelláris karcinoma esetében is, amely sejtek jelenléte rossz prognózisra utalt (Miyahara, Odunsi et

al. 2008, Sfanos, Bruno et al. 2008, Zhang, Yan et al. 2009). Egér emlőkarcinoma (4T1) esetében is bizonyították, hogy az IL-17 receptor géncsendesítése csökkentette a tumor túlélését és növekedését. Az IL-17 szabályozta hatás magyarázható lehet a neoplasztikus és sztróma sejtek IL-6 termelésével, amely hatásán keresztül Stat3 expresszió következik be. A Stat3 aktivációja mellett más tumor növekedést támogató és immunszuppresszióban részt vevő gének expressziója is megfigyelhető, de visszacsatolásként az IL-17 expresszióját is befolyásolja (Nam, Terabe et al. 2008). A daganatok típusától és mikrokörnyezetük heterogenitásától függően -ahogyan az általános gyulladásnak- az IL-17-függő gyulladásnak is lehet mind pozitív mind negatív hatása egyaránt a tumor növekedésére. Az MC38 vastagbél daganat sejtek fokozott növekedést mutatnak IL-17 deficiens egerekben (Kryczek, Wei et al. 2009), míg B16 egér melanoma esetében az *in vitro* melanoma antigén hatására polarizált Th17-es sejtek adoptív transzfere elősegítette a tumor növekedését (Muranski, Boni et al. 2008). Ez a mechanizmus az IFN- $\gamma$  hatásának tudható be; neutralizáló ellenanyagot alkalmazva megakadályozta a Th17 sejtek tumor növekedését elősegítő hatását, míg az IL-17 deficiens egerek tumorjában kevesebb IFN- $\gamma$  termelő sejt volt kimutatható.

### 3.3.3 Makrofágok

A makrofágok a természetes immunrendszer alkotói, amelyek a csontvelői mieloid progenitor sejtekből, a monocitákból differenciálódnak. A szövetekbe jutva érnek funkcionális makrofágokká, az ún. hivatásos antigén prezentáló sejtekké (APC). Fagocitálva, majd feldolgozva a sejteket és fehérjéket azok antigénjeit, a felszínükön folyamatosan expresszált, MHC I és MHC II molekulákon képesek bemutatni a CD8<sup>+</sup> ill. CD4<sup>+</sup> T limfocitáknak. Felismerik a vírussal fertőzött, az apoptotizáló és a tumoros sejteket egyaránt. A humorális és celluláris immunválasz során regulátoros és effektor funkciót is ellátnak.

A makrofágok egy igen heterogén populációt jelentenek. A CD4<sup>+</sup> T limfocitákhoz hasonlóan a makrofágok is a fenotípusuktól függően hozzájárulnak a tumorsejtek elpusztításához, de elősegíthetik a daganatok növekedését és metasztázis képzését egyaránt (2. ábra) (Henze and Mazzone 2016).

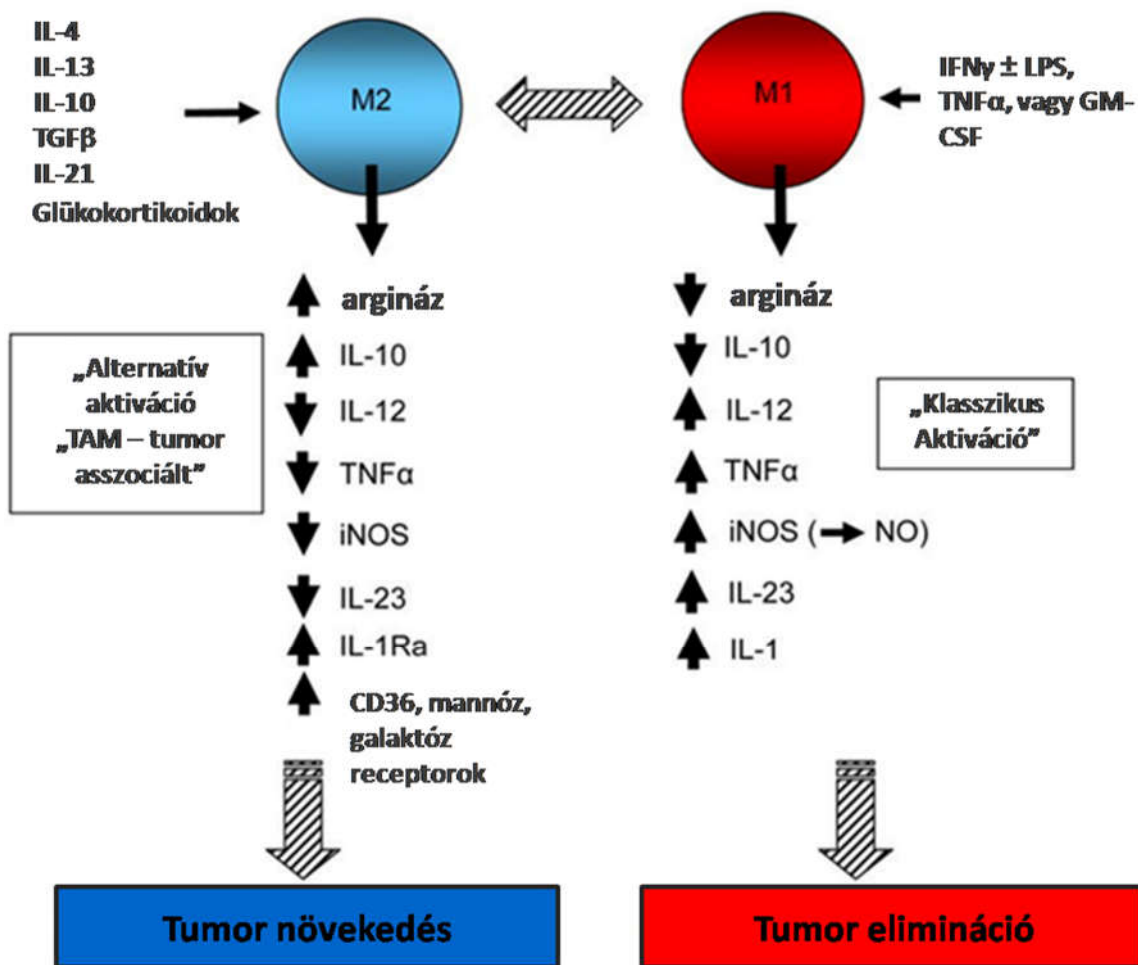
A makrofágokat két fő csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportba az M1-es típusú, vagy klasszikus úton aktiválódott makrofágok, míg a másik csoportba az M2-es, alternatív úton aktiválódott makrofágok tartoznak. A klasszikus úton aktiválódott M1-es polaritású

makrofágok elpusztítják a mikroorganizmusokat és tumor sejteket, míg bőséges mennyiségű gyulladásokeltő citokint termelnek. Ezzel ellentétben az M2-es típusú sejtek áthangolják a gyulladásos választ és a Th1-es immunitást elősegítve az angiogenezist és a metasztázis képzését a kötőszöveti mátrix átformálásával (Mantovani, Sozzani et al. 2002).

Az M1-es típusú makrofágok a Th1-es citokinek (gyulladásokeltő citokinek), mint például IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , granulocita-monocita kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) és mikrobiális termékek, mint például a bakteriális lipopoliszacharid (LPS) által aktiválódnak. Az IFN- $\gamma$ -t, amely az első számú M1-es polaritást kiváltó citokin a makrofágok és NK sejtek egyaránt termelik. Az IFN- $\gamma$  különböző gének expresszióját szabályozza, mint például citokin receptorok (IL6R, IL15R, IL2RA), sejt aktiváló markerek (CD36, CD38, CD97) és sejtadhéziós molekulák (intracelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM1), integrin alfa L, stb.) (Martinez and Gordon 2014). Az M1 irányába polarizált makrofágok nitrogén-monoxidot, gyulladásokeltő citokineket és kemokineket termelve, továbbá antigénprezentáló sejtként funkcionálva aktiválják a citotoxikus CD8<sup>+</sup> T sejteket, amelyek tumor ellenes hatást mutatnak (Gajewski, Schreiber et al. 2013).

Az LPS a Toll-like receptor (TLR)-4-en keresztül aktiválja és polarizálja M1-es irányba a makrofágokat. Újabb kutatások kimutatták, hogy TLR-4 független módon, az inflammaszóma aktivációján keresztül is képes makrofág aktivációt kiváltani (Kayagaki, Wong et al. 2013). A TLR4 aktiváció MyD88 és Mal/Tirap (Toll-interleukin 1 receptor domént tartalmazó adaptor fehérje)-függő útvonalon keresztül erős pro-inflammatorikus profilt eredményez, amely hatására gyulladásos citokinek (IFN- $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), kemokinek (CCL2, CXCL10, CXCL11) termelődnek továbbá antigén prezentáló molekulák (MHC I és MHC II) és kostimuláló molekulák expresszálódnak a makrofágok felszínén. Ezen profil kialakításában szerepet játszik az nukleáris faktor kappaB (NF- $\kappa$ B) és az aktivátor protein-1 (AP-1) jelátviteli útvonal (Hu and Ivashkiv 2009).

A szöveti makrofágok különböző M2-es alternatív aktivációs fenotípus kialakítására is képesek Th2-es citokinek (IL-4, IL-13, IL-21), immunszuppresszív citokinek (IL-10, TGF- $\beta$ ) és/vagy glükokortikoid hormonok, immunkomplexek és TLR agonisták hatására. Az M2-es makrofágokra jellemző, hogy nagy mennyiségű gyulladásokcsökkentő citokint és kemokint termelnek (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1RA, CCL22), magas szinten expresszálják mannóz és scavenger-A receptorokat, míg az IL-12 expressziós szintjük alacsony és ezzel egy időben alacsony antigén prezentációs képességgel rendelkeznek (Henze and Mazzone 2016).

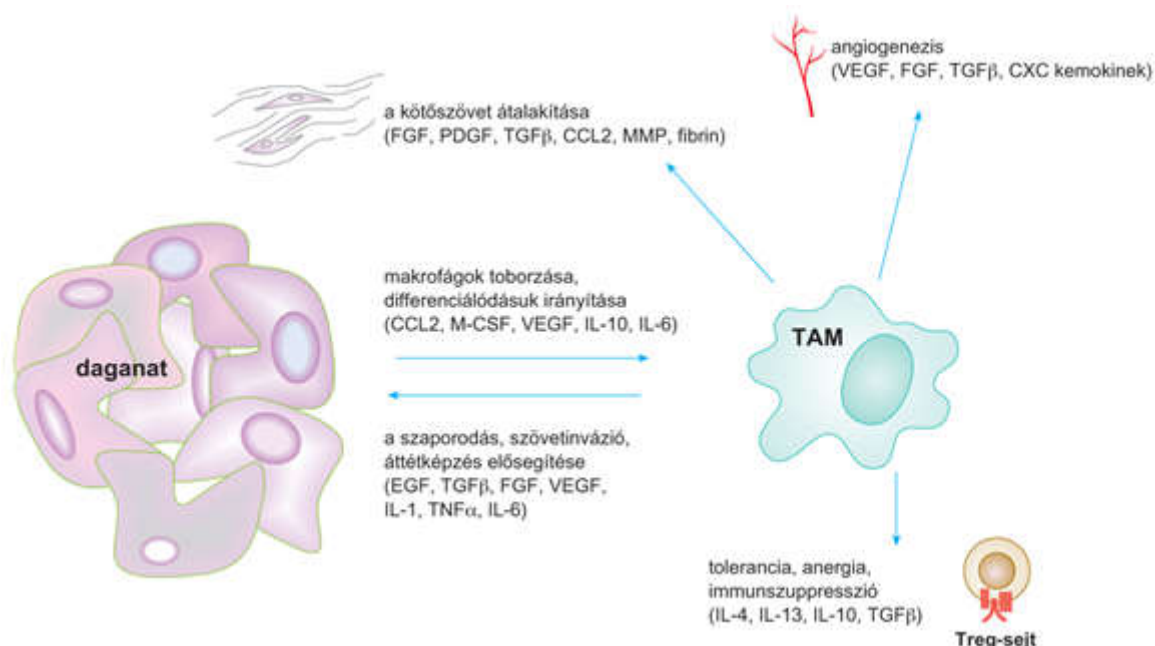


2. ábra: A makrofágok különböző citokinek/kemokinek és egyéb faktorok hatására mind tumor ellenes, mind tumor támogató fenotípust mutathatnak. A klasszikus úton aktivált, M1-es típusú makrofágok a tumor eliminálását támogató citokinek és egyéb faktorokat termelnek, amelyek citotoxikusak a tumor sejtekre nézve. Ezzel ellentétben, az M2-es polaritású makrofágok olyan citokinek nagy mennyiségben, amelyek a tumorigenezist támogató, 2-es típusú immunitás kialakítására képesek (Ostrand-Rosenberg 2008).

### Tumor asszociált makrofágok

A makrofágok fenotípusa és az aktivációs állapota nagyban függ a környezetük fizikai, kémiai és celluláris állapotától. A malignus és sztróma sejtek által termelt kemoattraktánsok hatására, mint pl. kemokin (C-C motívum) ligand 2 (CCL2), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), makrofág kolónia-stimuláló faktor (M-CSF), IL-10 és IL-6 a vérben keringő monociták a tumoros mikrokörnyezetbe infiltrálódnak. A tumor asszociált makrofágok (TAM) a tumor sztróma egyik fő alkotó elemei. Ezek a sejtek fibroblaszt (FGF) és epidermális növekedési faktort (EGF) termelve segíthetik a daganatsejtek fennmaradását, támogatják az érzékelést (VEGF, FGF, TGF-β), proteázaik előkészítik a kötőszövetet a

tumoros invázióhoz, továbbá citokin- és kemokin termelésük gátolja az adaptív immunválasz kialakulását (3. ábra) (Hallam, Escorcio-Correia et al. 2009).



**3. ábra: A tumor asszociált makrofágok szerepe a tumorigenezisben.** A daganat sejtek kemotaktikus anyagok kibocsátása révén odavonzzák a monocitákat, amelyek tumor asszociált makrofágokká (TAM) differenciálódnak. Ezek a megváltozott polaritású makrofágok olyan citokineket és kemokineket termelnek, amely hatással van az angiogenezisre, a mátrix átrendeződésre, immunszuppresszió kialakítására így biztosítva a tumor sejtek osztódását és metasztázis képzését.

([http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011\\_0001\\_524\\_Immunologia/ch22s02.html](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/ch22s02.html))

A legtöbb daganat esetében a TAM-ok M2-es polarizáltságot mutatnak. A tumor sejtek által kibocsátott IL-10, kolónia stimuláló faktor-1 (CSF-1) és mátrix komponensek aktiválják a makrofágokat és M2-es irányba polarizálják azokat (Hagemann, Wilson et al. 2006). A TAM-ról kimutatták, hogy alacsony antigén prezentációs képességgel rendelkeznek, ezáltal csökkentve a T sejtek aktivációját és proliferációját (Mantovani, Sozzani et al. 2002). A TAM-ok szuppresszív mediátorok termelése révén (pl. IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  és indolamin-dioxigenáz (IDO) metabolitok) gátolják a Th1-es választ és aktiválják a regulátoros T ( $T_{reg}$ ) sejtek működését. A  $T_{reg}$  sejtek gátolják az effektor T sejtek és monociták aktivitását. A  $T_{reg}$  sejtek tumor ellenes hatása összefüggésbe hozható a fokozott tumor növekedéssel (Sica, Larghi et al. 2008).

A CCL2 (MPC-1, monocita kemoatraktáns protein-1) a leggyakrabban előforduló kemokin a tumoros mikro környezetben. A CCL2 kemokinnról kimutatták, hogy nem csak a



TAM-ok kemotaxisában játszik fontos szerepet, hanem pl. prosztatata karcinoma esetében IL-6 termelődésével együtt támogatja a daganatos sejtek osztódását és elősegíti a makrofágok kettes típusú, azaz tumort támogató polarizálódását (Roca, Varsos et al. 2009). A normál melanocitákkal ellentétben a melanoma sejtek termelnek CCL2 kemokint. A melanoma tumorigenezise függ a CCL2 expressziójától és a makrofágok infiltrációjától a daganatos környezetbe (Nesbit, Schaidler et al. 2001).

Érdemes megemlíteni, hogy a különböző egér és humán (emlő, vese, petefészek) tumorokból származó TAM-ok M1-es típusú citokin expressziót is mutatnak, mint pl. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6 és CXCL8 a tumor típusától és fejlődési stádiumától függően (Lin and Karin 2007).

Mint az előző példákból is láthatjuk az immunsejtek tumor ellenes vagy tumor támogató hatását a tumor típusa és annak mikrokörnyezete határozza meg. **Általánosságban elmondható, hogy az egyes irányú polarizáltsággal rendelkező immunsejtek tumor ellenes, míg a kettes típusú sejtek tumor támogató tulajdonságokkal rendelkeznek (Johansson, Denardo et al. 2008, Ruffell, DeNardo et al. 2010).**

### 3.4 A melanoma

A melanoma egyike a leggyakoribb daganatoknak. A melanomás megbetegedések előfordulása ugrásszerűen megemelkedett az elmúlt 30 évben. A fehérbőrű, gyengén pigmentált európai rasszban jelentősen nagyobb az előfordulás gyakorisága, mint az erősen pigmentált populációban.

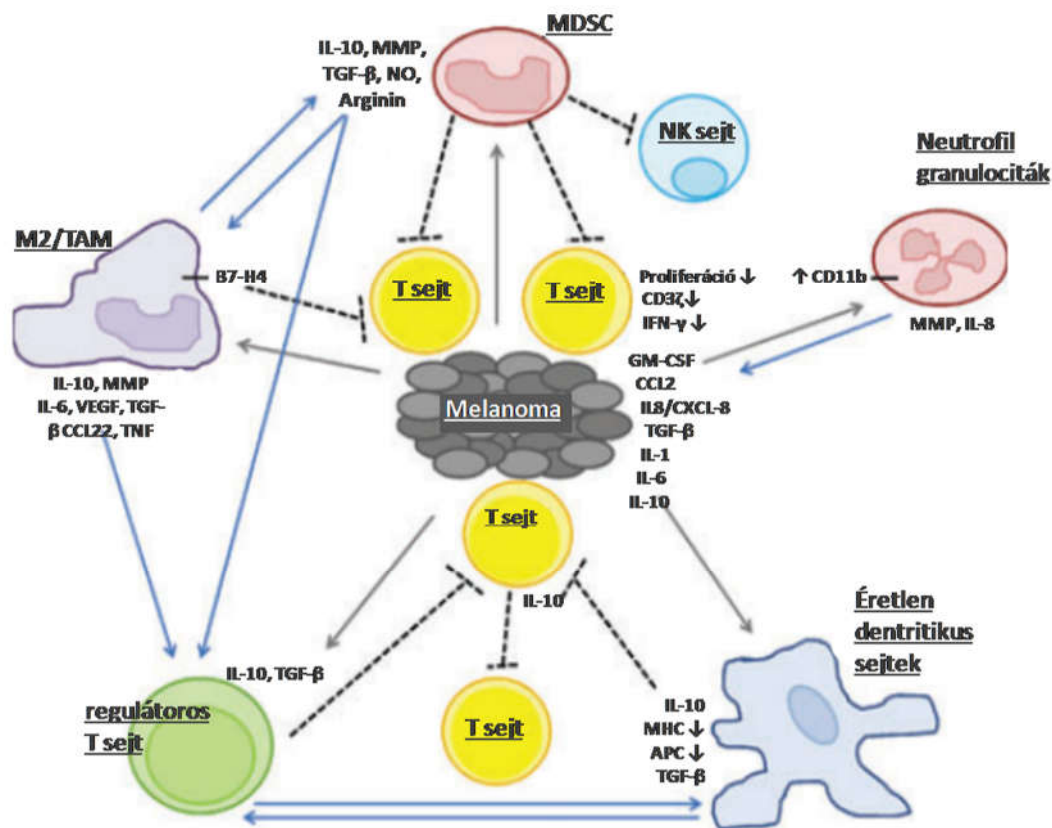
A melanoma a bőr alaprétegében (stratum basale) található, melanint termelő pigment sejtekből, a melanocitákból kialakuló rosszindulatú, invazív bőrdaganat (Bandarchi, Ma et al. 2010). Annak ellenére, hogy a melanoma kialakulásának mechanizmusa és oka intenzíven kutatott, a pontos folyamat még nem teljesen ismert. Elfogadott tény, hogy a kockázati tényezők között fontos szerepet játszik a genetikai hajlam és a bőrt érintő UV sugárzás (Schreiber, Moon et al. 1984, Whiteman and Green 1999).

A melanoma fejlődése öt különböző stádiumra osztható. Az első lépés egy már meglévő, vagy egy újonnan kialakuló anyajegy. A második stádiumban ez az anyajegy szabálytalanná válik; megváltozik a morfológiája és a melanin termelése. A harmadik stádium már egy rosszindulatú stádium, amelyet sugárirányú növekvő stádiumnak is neveznek (RGP; Radial Growth Phase). Ebben a stádiumban a primér melanoma lokálisan

invazív, de ekkor még hiányzik a metasztatizáló képessége. Ennek a stádiumnak az előrehaladásával jut el a megbetegedés az ún. vertikális növekedési stádiumba (VGF; Vertical Growth Phase), amelyet a melanoma progressziója követ. Ebben a stádiumban a melanoma sejtek beszűrődnek a dermiszbe és képessé válnak az áttétek képzésére. Utolsó fázis során a melanoma sejtek a nyirok- és vérkeringésbe jutva távolabbi szervekbe is áttétet képeznek; leggyakrabban a májba, lépbe, az agyba és a tüdőbe. A metasztatikus melanoma 10 éves túlélési aránya kevesebb, mint 15%.

Ahhoz, hogy a daganat képes legyen fennmaradni a szervezetben, meg kell kerülnie az immunrendszer felügyeletét. A melanomáról régóta ismert, hogy immunogén tumor, azaz aktiválja az immunrendszert; a tumorból készült mikroszkópos metszeteken gyakran látszanak reaktív immunsejtek. Az immunogenitására mutat rá az a tény is, hogy a melanomáról írták le az első ismert humán tumorantigéneket (van der Bruggen, Traversari et al. 1991). A melanoma számos antigént expresszál, ilyen például a MelanA/MART-1, melyet a citotoxikus T limfociták MHC I molekulán prezentálva felismerik, ezáltal a tumor kialakulásának kezdeti stádiumában képesek megakadályozni a tumor növekedését. Bár általában kimutatható a tumorelles immunválasz, korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a melanoma különböző eszközökkel képes elkerülni és elnyomni ezt az immunválaszt, mint például immunmoduláló citokinek és kemokinek termelésével (GM-CSF, makrofág kemoatraktáns protein 1 (CCL1), TGF- $\beta$ , IL1-6 és IL-10) (Ilkovitch and Lopez 2008). Az immunmoduláló, kemoatraktáns faktorok nem csak a melanoma sejtek migrációját és áttétképzését segítik elő, hanem odavonzanak olyan sejteket, amelyek tovább segítik a tumor progresszióját, az angiogenezist, a kötőszöveti mátrix átformálását és immunszuppresszív környezet kialakítását. Melanomás betegekben megnövekedett mennyiségű immunszuppresszív keringő DC-t és regulátoros T sejtet mutattak ki (McCarter, Baumgartner et al. 2007). Egy másik sejttípus, amely összefüggésbe hozható a melanoma immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakításával a mieloid-eredetű szupresszor sejtek (MDSC). A CD4 + és CD8 + T sejtek szuppressziója mellett az MDSC-k képesek gátolni az NK sejtek aktivitását, eltolni a monocita differenciációját M2-es irányba, továbbá elősegíteni a regulátoros T sejtek felhalmozódását a tumoros mikrokörnyezetben (4. ábra). A TAM-ok, amelyek M2-es polarizációval rendelkeznek, több különböző mechanizmussal támogatják a tumorogenezist (Mantovani, Sozzani et al. 2002, Sinha, Clements et al. 2007).

A melanoma által befolyásolt számos, az immunrendszer felügyeletét elkerülő mechanizmus mellett, a melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák is szerepet játszhatnak ebben a folyamatban.



**4. ábra:** A melanoma által termelt faktorok immunszuppresszív környezetet alakítanak ki. A melanoma különböző citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, továbbá mátrix metalloproteinázok termelésén keresztül befolyásolja az immunsejteket. Részletes leírást lásd a szövegben (Ilkovitch and Lopez 2008).

### 3.5 A melanoma terápiája

A primér melanoma korai stádiumban műtéti eljárással eltávolítható, viszont előrehaladott állapotban igen rosszak a túlélési esélyek. Attól függően, hogy hol és milyen méretűek az áttétek a kezelés magában foglalhatja a sebészeti beavatkozást és/vagy besugárzást és/vagy gyógyszeres terápiát. Mivel a melanoma gyakran képez agyi metasztázisokat, a besugárzást leginkább agyi áttétek esetében alkalmazzák. A gyógyszeres kezelésnek három fő csoportja van: kemo-, immuno-, és ún. célzott terápia (targeted therapy).

A metasztatizáló melanoma kezelésére a kemoterápiát már több mint három évtizede alkalmazzák. A kemoterápiás szerek magukba foglalják a DNS, RNS alkiláló ágenseket (dacarbazin, temozolomid), DNS károsodást okozó platina komplexeket (cisplatin,

carboplatin), és a mikrotubulus polimerizáció- és depolimerizációt gátlókat (vindesin, vinblastin, vincristin, paclitaxol) egyaránt. A felsorolt kemoterápiás szereket leggyakrabban kombinációs terápiaként alkalmazzák. A legelfogadottabb a BOLD protokoll, amely bleomycin (DNS töréseket hoz létre a sejtekben), vincristin (mikrotubulusok összerendeződését akadályozza meg), lomustin és dacarbazin (DNS, RNS alkiláló ágensek) keveréke. Ezek a citosztatikumok csak kevéssel növelik a betegek túlélését.

A metasztatikus melanoma biológiájának és a tumor immunológiájának alaposabb megismerése új terápiák kidolgozásához vezetett. Míg 2011-ig kevés kezelési alternatíva volt elérhető a melanoma kezelésére, mára bővült a terápiás protokollok száma. A melanomák több mint 50%-ban BRAF mutáció figyelhető meg, amely a MAPK útvonal folyamatos aktivitásához vezet. Kísérleti stádiumban lévő szelektív BRAF inhibitorok, a vemurafenib és dabrafenib, hatásosabbnak bizonyultak a kemoterápiás kezelésekkal szemben, megnövelve a betegek progressziómentes túlélési esélyeit (Jang and Atkins 2013).

Sokat ígérő eljárás a ma még kísérleti stádiumban levő „checkpoint” ellenanyagterápia. Ennek során a T sejttes immunválasz negatív regulátorait, a CTLA-4 (T-limfocita-asszociált antigén 4) és a PD1 (programozott sejthalál protein 1) sejtfelszíni molekulákat inaktíválják antagonistá ellenanyag kezeléssel (Tang, Eldabaje et al. 2016).

### **3.6 A nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B)**

A nukleáris faktor-kappa B transzkripció faktor (NF- $\kappa$ B) 1986-ban fedezte fel Ranjan Sen és David Baltimore (Sen and Baltimore 1986). A NF- $\kappa$ B transzkripció faktor fontos szerepet játszik a sejt működés szabályozásában; többek között az immunsejtek aktivációjában, az apoptózisban, a proliferációban, a differenciációban és az onkogén transzformációban egyaránt (Abraham 2000, Makarov 2000, Escarcega, Fuentes-Alexandro et al. 2007). Az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal folyamatosan aktivitását különböző daganatokban, mint pl. emlő, vastagbél, hasnyálmirigy, petefészek daganat és melanoma is kimutatták (Bours, Dejardin et al. 1994, Sovak, Bellas et al. 1997, Wang, Abbruzzese et al. 1999, Amiri and Richmond 2005). Fokozott aktivitása kapcsolatba hozható a daganatképzés különböző lépéseivel, mint az angiogenezis, az invázió, az áttétképzés.

Minden emlős NF- $\kappa$ B transzkripció faktor rendelkezik egy erősen konzervált, ~300 aminosavból álló Rel homológ doménnel az N terminálison, amely szerepet játszik a DNS-hez való kötésben, a dimerizációban és a gátló faktorokkal (I $\kappa$ B) való kölcsönhatásban.

Az emlős NF- $\kappa$ B fehérje család öt tagból áll, melyeket két osztályba sorolnak. Az első osztályba a RelA (p65), RelB, és c-Rel tagok tartoznak, amelyek érett fehérje formájában expresszálódnak és egy transzkripciót aktiváló doménnel rendelkeznek a C terminális végükön. A második osztályba tartozik az NF- $\kappa$ B1 (p105/p50) és az NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), amely fehérjék nagyméretű prekursor molekulák (p100 és p105) formájában expresszálódnak. A p105 prekursor molekulából folyamatosan keletkezik a p50 alegység, míg a p100-ból csak stimulációt követő proteolízissel keletkezik p52 alegység. Az osztály tagjai a transzkripció repressziójáért felelősek. Minden tag képes homo- és heterodimert alkotni (kivéve a Rel B-t, amely kizárólag heterodimerek képzésére alkalmas), amelyeknek különböző DNS kötő helyük és affinitásuk van.

Az NF- $\kappa$ B fehérjék a citoplazmában, inaktív formában az inhibitor kappa B fehérjékkel (I $\kappa$ B) dimert alkotva vannak jelen. Az I $\kappa$ B három fehérjéből áll: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ . A fehérje család további tagjai (I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\delta$ , I $\kappa$ B $\zeta$ , Bcl-3 és az I $\kappa$ B<sub>NS</sub>) is azonosításra kerültek.

Aktivációs szignál hatására, mint pl. stressz, ultraibolya sugárzás, citokinek, szabadgyökök, kemoterápiás szerek, bakteriális és vírus antigének, stb. az I $\kappa$ B-kináz (IKK) komplex aktiválódik és foszforilálja az I $\kappa$ B-t. A foszforilációt az I $\kappa$ B poliubiquitinizációja, majd 26S proteasómában történő degradációja követi. Az NF- $\kappa$ B alegységek felszabadulnak és transzlokálódnak a sejtmagba, ahol specifikus DNS promóter szekvenciákhoz kötődve több gén átírását szabályozzák, mint pl. citokinek, növekedési faktorok, sejt adhéziós molekulák, pro- és anti-apoptotikus fehérjék (Baldwin 2001). Az NF- $\kappa$ B aktiváció több útvonalon valósulhat meg. A klasszikus útvonal során az NF- $\kappa$ B aktivációját a gyulladásos citokinek mellett (pl. TNF- $\alpha$ , IL-1) bakteriális- és vírusfertőzések váltják ki. Az aktiváció specifikus receptorokon keresztül valósul meg, mint pl. tumor nekrozis faktor receptor 1 és 2 (TNFR1 és TNFR2) interleukin (IL)-1 receptor, T sejt receptor (TCR), Toll-like receptor (TLR). Stimuláció hatására az IKK komplex IKK $\beta$ , majd IKK $\alpha$  alegysége aktiválódik, amely hatására foszforilálódik és degradálódik az I $\kappa$ B. Ez az útvonal elsősorban a p50:RelA és p50:c-Rel heterodimereket érinti.

Az alternatív útvonal során a p52:RelB szelektív aktivációja valósul meg; a p100 prekursor fehérjéből p52 keletkezik, amely a RelB-vel komplexet képezve transzlokálódik a sejtmagba. Ezt az útvonalat a TNF citokin család tagjai aktiválják, amely során az IKK $\alpha$  homodimerek szelektív aktivációja valósul meg az NF- $\kappa$ B indukáló kináz által. Ez az útvonal szükséges a másodlagos nyirokszervek fejlődéséhez és a B sejtek éréséhez/túléléséhez (Caamano and Hunter 2002).

Fontos megjegyezni, hogy az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor célgénjei közé olyan molekulák is tartoznak, amelyek fokozzák (pl. TNF- $\alpha$ ), illetve gátolják (pl. I $\kappa$ B $\alpha$ ) az NF- $\kappa$ B aktivációt (Mitchell, Vargas et al. 2016).

Létezik egy harmadik, még nem teljes mértékben tisztázott NF- $\kappa$ B aktivációs útvonal is, amely nem IKK függő. Ezen útvonal során a kazein kináz II aktiváció hatására egy szerin/treonin kináz foszforilálja az I $\kappa$ B $\alpha$ , felszabadítva az NF- $\kappa$ B molekulát a gátlás alól. Ezt az útvonalat az UV-A (320-400 nm) és UV-B (280-320 nm) sugárzás hatására történő DNS károsodás váltja ki a nem melanoma típusú bőrdaganatok esetében (Sen and Baltimore 1986).

Az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktorról tudott, hogy makrofágok esetében is több különböző gén expresszióját szabályozza. M1-es stimulusok hatására, mint pl. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  és TLR ligandok aktiválódik a klasszikus NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal. De több a tumorigenezist elősegítő gén expressziója is mint pl. VEGF, IL-6, TNF- $\alpha$  és ciklooxygenáz-2 (COX-2) is az NF- $\kappa$ B szignáltranszdukciós útvonal által szabályozott, amelyek elengedhetetlenek a TAM-ok aktivációjához (Biswas and Lewis 2010).

### **3.6.1 Az NF-kappa B aktivitás szerepe a daganatképzésben és a kemoterápiás szerek elleni rezisztenciában.**

Több daganat, mint pl. emlő, vastagbél, hasnyálmirigy, petefészek daganat és melanoma esetében kimutatták, hogy a tumor sejtekben az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal folyamatosan aktív (Bours, Dejardin et al. 1994, Sovak, Bellas et al. 1997, Wang, Abbruzzese et al. 1999, Amiri and Richmond 2005). Fokozott aktivitása kapcsolatba hozható a daganatképzés különböző lépéseivel, mint az angiogenezis, az invázió, és az áttétképzés.

Ha egy sejtet stressz ér, többféle mechanizmussal igyekszik védekezni. A stressz válasz egyik alapvető komponense az NF- $\kappa$ B szignálút. Ismert, hogy más stresszorokhoz hasonlóan egyes citosztatikumok is növelik az NF- $\kappa$ B aktivitást, mint például a doxorubicin, ciklofoszfamid (Das and White 1997, Tergaonkar, Bottero et al. 2003). A kemoterápiás szerek hatására aktiválódott NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal által szabályozott túlélési mechanizmusok hozzájárulhatnak a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakításához (Fujioka, Son et al. 2012). A kemoterápia az NF- $\kappa$ B szignálút aktiválása mellett az exoszómatermelés fokozódásához is vezet (Lv, Wan et al. 2012).

### 3.6.2 A nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) és a melanoma

*In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy a humán melanoma sejtvonalakban az NF- $\kappa$ B szignálút folyamatosan aktív a normál melanocitákhoz képest (McNulty, Tohidian et al. 2001). Ez a megfigyelés korrelál a klinikai adatokkal, miszerint a diszplasztikus anyajegyek és a melanoma sejtek magjában a p50 és RelA fehérjék magas szintű expressziót mutattak a normál bőrben lévő melanocitákhoz képest (McNulty, del Rosario et al. 2004). A malignus melanoma sejtekben az IKK folyamatosan aktív, melynek eredményeként az I $\kappa$ B gyorsan degradálódik, így az NF- $\kappa$ B a magba lokalizálódik, ahol több gén átírását eredményezi (Yang and Richmond 2001, Dhawan and Richmond 2002). Hs294T melanoma sejtekben kimutatták, hogy az I $\kappa$ B $\alpha$  degradációja és szintézise közötti egyensúly eltolódott a degradáció irányába, amely az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor folyamatos aktivációjához és magba történő lokalizációjához vezet (Shattuck-Brandt and Richmond 1997). A melanoma esetében kimutatták, hogy az NF- $\kappa$ B aktiváció hatására anti-apoptotikus fehérjék (pl. TRAF1, TRAF2, cIAP1, cIAP2, ML-IAP; survivin, Bcl-2), angiogenezisben szerepet játszó fehérjék (pl. VEGF, CXCL-8, CXCL-1, TNF- $\alpha$ , IL-1) és a migrációt segítő fehérjék (pl. ICAM-1, VCAM-1, MMP-k, COX-2) termelődnek (Amiri and Richmond 2005). Továbbá a melanoma sejtek folyamatos NF- $\kappa$ B aktivációja hozzájárul a CXCL1 fehérje expressziójához, amely fontos szerepet játszik a melanoma pathogenezisében (Yang and Richmond 2001). A melanomás estek több mint 50%-ban kimutatható BRAF gén szekvenciájának megváltozása, ami zömében a BRAF<sup>V600E</sup> (az aminosav szekvencia 600. pozíciójában a glutaminsav helyett valin épül be) mutációt jelenti. A mutáns BRAF aktiváció összefüggésben van a fokozott IKK aktivációval, és az ezt kísérő I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitinizációval és degradációval. Mindezek hatására az NF- $\kappa$ B folyamatos aktivációja a melanoma sejtek megnövekedett túlélését eredményezi (Liu, Suresh Kumar et al. 2007).

### 3.6.3 NF-kappaB gátlószerek feltételezett szerepe a tumor terápiában

Mivel NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik az onkogenezisben számos, a jelátviteli útvonalat gátló hatóanyag van kipróbálás alatt. A hatóanyagok részben már felhasználásra jóváhagyott, klinikai kipróbálás alatt álló és előkísérletek alapján hatásosnak bizonyult komponensek (Basseres and Baldwin 2006).

Az NF- $\kappa$ B inhibitorokat kémiai tulajdonságaik alapján a következő csoportokba sorolják:

- természetes „forrásból” származó kismolekulák, pl. kurkumin, rezveratrol

- szintetikus kismolekulák, pl. proteoszóma inhibitorok (pl. VELCADE/Bortezomib/PS-341) és nem szteroid gyulladáscsökkentők (pl. szulfaszalazin)
- sejtporomeabilizáló peptidek (SN-50)
- génterápia (I $\kappa$ B $\alpha$ -szuper represszor és NF- $\kappa$ B „csali” oligonukleotid overexpressziója)

Az NF- $\kappa$ B inhibitorok a jelátviteli útvonal különböző pontjain hatnak. Kifejthetik hatásukat:

- az IKK direkt gátlásán keresztül (Bay 11-7082)
- a proteoszóma gátlásán keresztül (Bortezomib)
- megakadályozhatják a nukleáris transzlokációt (SN-50)
- megakadályozhatják az NF- $\kappa$ B kötődését a DNS-hez (nem szteroid gyulladáscsökkentők) (Shen and Tergaonkar 2009).



### ***Proteaszóma inhibitorok***

A proteaszóma fehérjebontó enzimkomplex felelős különböző fehérjék, többek között az I $\kappa$ B család tagjainak a lebontásáért. Ebből kiindulva olyan proteaszóma inhibitorok, amelyek megakadályozzák az I $\kappa$ B fehérjék lebontását használhatóak lehetnek a daganatos megbetegedések során az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal gátlására. A felnőttkori T sejt leukémia esetében a PS-341 alkalmazása stabilizálja az I $\kappa$ B $\alpha$ -t, következésképpen gátolja az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonalat, amely a károsodott sejt osztódás gátlásához és apoptózis indukciójához vezet (Nasr, El-Sabban et al. 2005). A nagy specificitású proteaszóma inhibitor a PS-341 elfogadott terápiás szer mieloma kezelésére, amely megbetegedés összefüggésbe hozható az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal nem megfelelő működésével (Richardson, Hideshima et al. 2004). A PS-341-et hatásosnak találták glioblasztóma (Yin, Zhou et al. 2005) és melanoma esetében egyaránt. A melanoma sejtek osztódását már nanomolos (0,1-10nM) koncentrációban megakadályozza. Temozolomiddal együtt alkalmazva - amely egy konvencionális kemoterápiás szer - a PS-341 proteaszóma inhibitor teljes melanoma remissziót eredményezett xenograft egérmodellben (Amiri, Horton et al. 2004).

### ***Thalidomidok és származékai***

A thalidomid gyulladáscsökkentő szer, amely tumor ellenes hatással is rendelkezik. Mieloma multiplex esetében hatásosnak találták; a betegség korai stádiumában dexametazonnal együtt alkalmazva 70%-os válaszadási rátát mutatott. Önmagában csak mintegy 35%-ban bizonyult hatásosnak (Rajkumar 2003). Bizonyították, hogy a kezelés hatására leáll a plazma sejtek osztódása és apoptotizálnak, amely folyamat az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal gátlásán keresztül valósul meg (Mitsiades, Mitsiades et al. 2002). A thalidomid gátolja az IKK aktivitását (Keifer, Guttridge et al. 2001).

### ***Nem-szteroid gyulladáscsökkentők***

A nem szteroid gyulladáscsökkentőkről általánosan elfogadott, hogy gátolják a COX-2 aktivitását, de mindemellett az is bizonyított, hogy az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonalat is megcélazzák. Kimutatták, hogy a celecoxib, amely egy COX-2 inhibitor képes megakadályozni *in vitro* körülmények között a TNF- $\alpha$  indukálta NF- $\kappa$ B aktivitását azáltal, hogy szupresszálja az IKK és Akt aktivitását (Shishodia, Koul et al. 2004). A szulfasalazinról, amely szintén egy nem szteroid gyulladáscsökkentő kimutatták, hogy glioblasztóma sejtvonalak és primér sejt kultúrákon egyaránt sejt osztódást gátol és apoptózist indukál, az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal gátlásán keresztül (Robe, Bentires-Alj et al. 2004).

### **Kurkumin és IKK inhibitorok**

A kurkumin egyike a legjobban kutatott komponenseknek, amelyről kimutatták, hogy gátolja az NF- $\kappa$ B aktivitását és az általa szabályozott gének expresszióját. Hatással van a tumorigenezis, az angiogenezis és a metasztázis képzésének gátlására egyaránt (Panahi, Darvishi et al. 2016). A kurkumin angiogenezis és metasztázis gátló hatással rendelkezik egér melanoma modellekben. B16F10-el oltott egereket kurkuminnal kezelve szignifikánsan megakadályozta a mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2) aktivitását ezáltal csökkentette a primér tumor növekedését (Banerji, Chakrabarti et al. 2004).

A BMS-345541 szelektív IKK $\beta$  inhibitor, amely reverzibilisen csökkenti az IKK aktivitását és megakadályozza az NF- $\kappa$ B/p65 sejtmagba való transzlokációját (Burke, Pattoli et al. 2003). Kimutatták, hogy képes megakadályozni a melanoma sejtek (A375, SK.MEL-5 és Hs 294T) hiper-proliferációját *in vitro* és a melanoma sejtek tumorigenitását *in vivo* (Yang, Amiri et al. 2006).

Egy másik lehetséges IKK inhibitor az NBD (NEMO-kötő domén) peptid. Ez a rövid peptid fuzionálva van egy *Drosophila* Antennapedia homeodoménnel, amely segíti a membrán transzlokációt és magas affinitással köt az IKK komplexhez. Az NBD peptid gátolja az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalat azáltal, hogy kötődik az IKK $\alpha$  és IKK $\beta$  katalitikus alegységekhez megakadályozva a NEMO regulátor fehérje kapcsolódását. A375 melanoma esetében, amelyre a magas szintű NF- $\kappa$ B aktivitás jellemző, dózisfüggően sejtosztódás gátlónak bizonyult. Az NDB kezelés megakadályozta az NF- $\kappa$ B DNS-hez való kötődését és kaspáz-3 aktiváción keresztül a melanoma sejtek apoptózist indukálta (Ianaro, Tersigni et al. 2009, Madonna, Ullman et al. 2012).

### **3.7 A vanillin (metil-vanillin; 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehid)**

A vanillin legfőbb komponense a *Vanilla* nemzetségbe tartozó növények termésének, mindemellett különböző orchidea fajokban, a burgonya virágában, bükkfa és hársfa kérgében is előfordul. A vanília fő illatanyaga. Mivel a természetben igen kis mennyiségben fordul elő, így a felhasználásra kerülő vanillin jelentős részét szintetikus úton állítják elő. A vanillin széles körben alkalmazzák illatanyagként és ízesítéként az élelmiszer és gyógyszeriparban egyaránt.

A vanillin biológiai aktivitását eddig is intenzíven kutatták. Kimutatták, hogy spontán és indukált mutációkkal szemben is védelmet nyújt, megakadályozva a DNS

károsodását humán sejtekben (King, Shaughnessy et al. 2007), *Salmonella* TA104 (Shaughnessy, Setzer et al. 2001) és *Escherichia coli* (Shaughnessy, Schaaper et al. 2006) fertőzés esetében egyaránt. Antioxidáns (Kumar, Priyadarsini et al. 2004), antimikrobiális (Fitzgerald, Stratford et al. 2004) és fájdalomcsillapító (Park, Sim et al. 2009, Beaudry, Ross et al. 2010) hatása mellett a sarlósejtes anémia (Abraham, Mehanna et al. 1991) esetében is hatásosnak találták.

Annak ellenére, hogy a vanillin szinte egyáltalán nem toxikus ( $LD_{50}=1330$  mg/kg), mégis fokozni képes különböző DNS károsító ágensek pl. a ciszplatin (Durant and Karran 2003) és mitomycin C (Gustafson, Franz et al. 2000) citotoxikus hatását.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a vanillin kezelés *in vitro* megakadályozza a 4T1 egér emlő karcinoma sejtek invázióját és migrációját, míg *in vivo* körülmények között - annak ellenére, hogy a primér daganat méretét nem befolyásolja - a tüdőben kialakuló áttétek számát szignifikánsan csökkenti (Lirdprapamongkol, Sakurai et al. 2005). A tumor sejtek anti-metasztatikus és invázió ellenes hatását többek között a mátrix metalloproteinázok (MMP), leggyakrabban a MMP-9 gátlásán keresztül valósítják meg. A hepatocelluláris karcinoma esetében az MMP-9 gátlásának hatására az I $\kappa$ B foszforilációja és degradációja nem valósul meg, így az NF- $\kappa$ B szignálút is gátlódik (Liang, Wu et al. 2009). A vanillin fokozza a TRAIL (TNF-hez hasonló apoptózist indukáló ligand)-indukálta apoptózist humán adenokarcinoma esetében (HeLa) azáltal, hogy gátolja az NF- $\kappa$ B választ (Lirdprapamongkol, Sakurai et al. 2010). Továbbá bizonyították, hogy a vanillin megakadályozza az LPS-indukálta NF- $\kappa$ B aktivációt és a COX-2 gén expresszióját Raw 264.7 egér makrofágokban (Murakami, Hirata et al. 2007).

A vanillin kezelés nemcsak megakadályozni képes a 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav (TNBS)-indukálta vastagbélgyulladás kialakulását, hanem javítja a kialakult betegség patomechanizmusát. A hatásmechanizmus az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal gátlásán keresztül valósul meg. Wu és munkatársai bizonyították, hogy a vanillin *in vivo* körülmények között megakadályozza a p65 transzlokációját, az I $\kappa$ B $\alpha$  foszforilációját és az IKK aktivációját. A vanillin kezelés csökkenti a bélszövet pro-inflammatorikus citokinjeinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) expresszióját, míg az IL-4 gyulladáscsökkentő citokin expresszióját fokozza (Wu, Chen et al. 2009).

Az eddigi tanulmányok az mutatják, hogy a vanillin az NF- $\kappa$ B szignáltranszdukciós útvonal gátlásán keresztül képes megakadályozni a daganatos sejtek invázióját, metasztázis képzését és az angiogenezist egyaránt, így lehetőséget nyújt újabb tumor ellenes hatóanyagok kifejlesztésére. Mivel a vanillin szinte egyáltalán nem toxikus, lehetőséget

biztosít a daganatos sejtek érzékenyítésére olyan kemoterápiás szerekkel szemben, amelyek aktiválják az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalat.

### 3.8 Az exoszómák

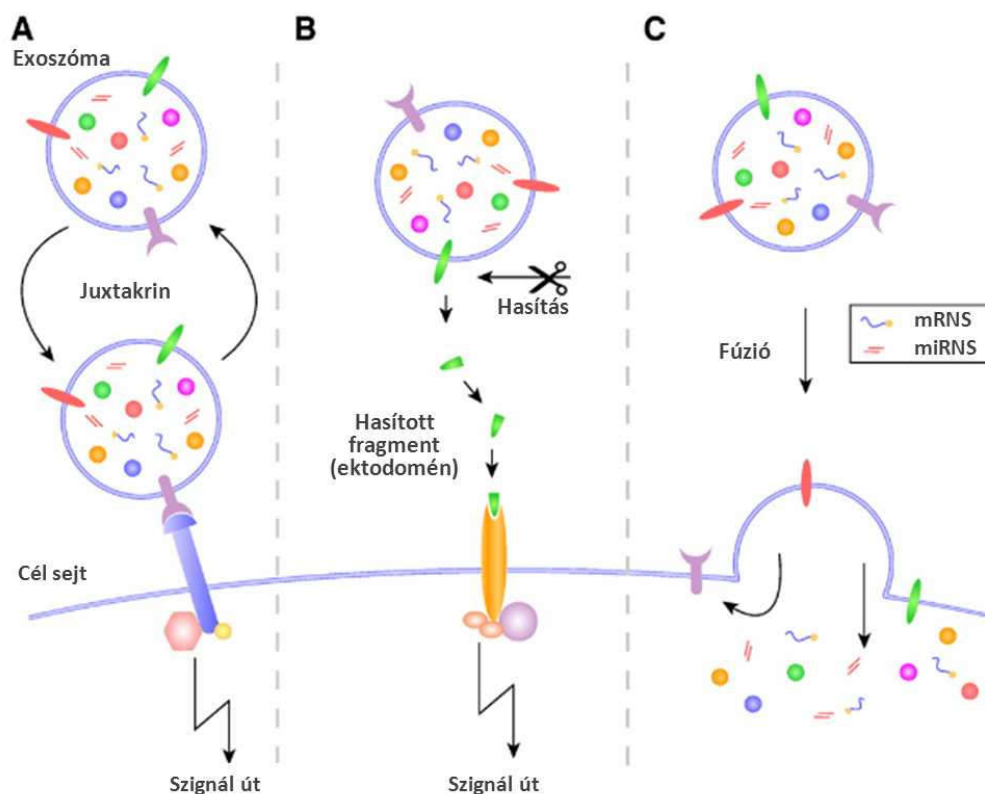
Az első exoszómákkal kapcsolatos kutatások az 1980-as évekre vezethetőek vissza. 1981-ben Trams használta először az exoszóma elnevezést, amikor megfigyelte, hogy a sejtekről leváló vezikulumok a gazdas sejtre jellemző enzimaktivitást mutatnak (Trams, Lauter et al. 1981). Majd ezt követően Johnstone és munkatársai a retikulocitákról lefüződő transferrin molekulákat tartalmazó, 50  $\mu$ m-es vezikulákról, azaz exoszómákról számolt be (Johnstone, Adam et al. 1987). Az exoszómák a sejtek által kibocsátott vezikulák egy speciális csoportja, amelyek 30-100 nm átmérőjű, kettős membránnal körülvett vezikulák. A korai endoszómák „fordított bimbózással” (reverse budding) multivezikuláris testekbe (MVB) tömörülnek, majd elkerülve a lizoszomális emésztést, fúzionálnak a sejtmembránnal, amely során az extracelluláris térbe szabaddá válnak az exoszómák. A multivezikuláris endoszómák biogenezisét az ún. ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), a transzporthoz nélkülözhetetlen endoszomális komplexek végzik, de feltehetően más útvonal is létezik (Trajkovic, Hsu et al. 2008). Az ESCRT-0, -I és II komplex felismeri és elkülöníti az ubikvitinált endoszomális membrán fehérjéket, az ESCRT III komplex pedig nagy valószínűséggel a membrán lefüződésben játszik szerepet. Összességében az ESCRT az ubikvitinált membrán fehérjéket ismeri fel és multivezikuláris endoszómába való internalizálódásukat promótálja (Trajkovic, Hsu et al. 2008). Az exoszómák szekrécióját a Rab GTP-áz 27a és 27b segíti elő. Az exoszómák keletkezésének és tartalmának kialakulása még nem teljesen tisztázott. Mivel az exoszómák endoszomális eredetűek, az eddigi vizsgálatok azt mutatják, hogy (például a melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák) nem tartalmaznak a mitokondriumra, vagy endoplazmatikus retikulumra jellemző fehérjéket (Mears, Craven et al. 2004).

Minden emlős sejt által kibocsátott exoszóma közös jellemzővel rendelkezik, hasonló: a szerkezetük (kettős membránnal körülvett vezikulumok); méretük (30-100 nm); denzitásuk (1,13-1,19 g/ml); összfehérje tartalmuk (Thery, Zitvogel et al. 2002). A vezikulák tartalma viszont igen változatos. A membránnal határolt kompartmentekben szignál peptidek, mRNS-ek, microRNS-ek, lipidek és egyéb fehérjék találhatóak, amelyek ingáznak a donor és a recipiens sejt között (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Bizonyos fehérjék az exoszómák membránjában helyezkednek el, míg mások a vezikulák lumenében találhatóak.

Ezek a fehérjék magukba foglalják a citoplazmatikus fehérjéket (tubulin, aktin, aktin kötő fehérjék, annexinek, Rab-fehérjék), és a jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérjéket (protein kinázok és G-fehérjék). Gyakran előforduló fehérjék még a hősokk fehérjék (Hsp73, Hsp90), tetraspaninok (CD9, CD63, CD81, CD82), a Fas ligand (FasL) és a TNF kapcsolt apoptózis ligand (APO2L/TRAIL) (Simpson, Lim et al. 2009, Mathivanan, Ji et al. 2010). Az exoszómák fontos mediátorai a sejt-sejt közötti kommunikációnak; hatást gyakorolnak az immunválaszra, a tumoros mikrokörnyezetre, az angiogenezisre és a metasztázis képzésre egyaránt (Kahlert and Kalluri 2013).

Az exoszómák molekuláris összetétele függ a kibocsátó sejt típusától, pl. a dendritikus sejtekből, a B-limfocitákból és hízósejtekből származó exoszómák membránja gazdagon tartalmaz MHC I és MHC II molekulákat (Stoorvogel, Kleijmeer et al. 2002, Thery, Zitvogel et al. 2002). Az epitéliális tumorsejtek által szekretált exoszómák epitéliális sejtadhéziós molekulát (EpCAM), míg a melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák tumor-asszociált antigént (Mart-1) hordoznak (Mears, Craven et al. 2004). A bél-, emlő- és hasnyálmirigysejtekből származó exoszómák humán epidermális receptor családot (HER) expresszálnak (Ciravolo, Huber et al. 2012).

Az exoszómák felvétele a recipiens sejt által történhet receptor mediálta endocitózissal, pinocitózissal, fagocitózissal vagy membránfúzióval is. Kutatások bebizonyították, hogy a tetraspanin-integrin komplex nagymértékben hozzájárul az exoszómák célsejthez történő kapcsolódásához (Milane, Singh et al. 2015). A gyulladásos környezet képes fokozni olyan adhéziós molekulák, mint pl.: ICAM-1 expresszióját a membrán felszínen, melyek az exoszómák célsejthez történő kapcsolódását segítik elő (Clayton, Turkes et al. 2004). A kapcsolódást követő internalizációs lépések egyelőre nem tisztázottak, de a T-sejt receptor/CD3 komplex, illetve a T-sejt vezérelte exoszómákon lévő CXCR-4 kemokin receptor jelenléte juxtakrin útvonalon keresztül receptor-ligand interakciót feltételez (Blanchard, Lankar et al. 2002). Az exoszómák képesek közvetlenül is fuzionálni a célsejttel, ami tartalmuk azonnali citoplazmába történő felszabadulásához vezet. Az internalizáció aktin citoszkeleton és foszfatidil-inozitol 3-kináz függő fagocitózis útján is bekövetkezhet (Mathivanan, Ji et al. 2010). A rákos sejtek vezérelte exoszómák specifikus célbajuttatása és metasztázis képzésben betöltött pontos szerepe egyelőre még nem tisztázott (5. ábra).



**5. ábra Az exoszómák lehetséges intracelluláris kommunikációja.** A. Az exoszómák membránfehérjéi a célsejt sejtfelszíni receptorán keresztül jelátviteli útvonalakat indítanak el (juxtakrin jelátvitel). B. Az exoszómák membránfehérjéit proteázok hasítják az extracelluláris térben. Az elhasított fragmentumok szolubilis ligandként kötődni tudnak a célsejt sejtfelszíni receptorához, amelyen keresztül jelátviteli kaskádokat indíthatnak el. C. Az exoszómák fuzionálnak a célsejt membránjával, így azok tartalma nem szelektív úton bekerül a célsejt belsejébe (Mathivanan, Ji et al. 2010).

Minden sejttípus, beleértve a tumor sejteket is, képes exoszómákat termelni és kibocsátani. Az egészséges/normál valamint a rákos sejtek által kibocsátott exoszómák különbségeiről már számos tanulmány beszámolt, amelyek szerint az exoszómák mennyisége és azok tartalma (főként a miRNS összetétele) is eltérő lehet. Számos daganatos sejtvonal esetében kimutatták, hogy több exoszómát termelnek, mint a normál sejtek. Riches és munkatársai például rávilágítottak arra, hogy egy normál humán epitél sejtvonal és az ebből származó mellrák klón exoszóma kibocsátása eltérő. Míg az egészséges sejtek 24 óra elteltével  $(4,5 \pm 2,3) \times 10^8$ , addig a rákos sejtvonal  $(53,2 \pm 1,6) \times 10^8$  exoszómát bocsátott ki (Riches, Campbell et al. 2014). A tumorok hipoxiás és savas környezete lehet az egyik magyarázat a megnövekedett exoszóma termelésre (Parolini, Federici et al. 2009, Park, Tan et al. 2010).

### 3.8.1 Az exoszómák szerepe a gazda-tumor kommunikációban

A tumor mikrokörnyezete fontos szerepet játszik az immunválasz szabályozásában, a daganatok fejlődésében és a metasztázisok kialakulásában egyaránt. A tumorok kemoterápiás szerekkel és radioterápiával szembeni rezisztenciájának, az immunrendszer felügyeletének elkerülése illetve immunszuppresszív környezet kialakításának egyik lehetséges mechanizmusa az általuk termelt exoszómák kibocsátása lehet. A heterogén tumorsejtek által kibocsátott exoszómák változatos tartalma és sokrétű hatása összetett interakciós hálózatot alakít ki.

Hong és munkatársai kimutatták, hogy a vastagbél daganatból származó exoszómák gazdagon tartalmaznak sejtciklust szabályozó mRNS-eket (legtöbbjük mitózisban vesz részt), amelyek elősegítik az endotél sejtek proliferációját. Ezen jelenségek arra utalnak, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák szerepet játszanak a daganat növekedésében és metasztázis képzésében, valamint befolyásolhatják az angiogenezist (Hong, Cho et al. 2009). Hepatocelluláris karcinoma esetében a tumorsejtek által kibocsátott exoszómák megváltoztatják a TGF- $\beta$ -aktivált kináz-1 expresszióját és jelátviteli útvonalát, amely hatására tumorsejt proliferáció volt megfigyelhető (Kogure, Lin et al. 2011). A glióma sejtek által kibocsátott exoszómák membránjában található mutáns epidermális növekedési faktor receptor (EGFRvIII) az exoszómák által átszállítható a mutáns receptort nem tartalmazó sejtekbe. Az EGFRvIII integráció megnövekedett osztódási képességgel, illetve anti-apoptotikus gének nagyfokú expressziójával ruházta fel a sejteket (Al-Nedawi, Meehan et al. 2008). Az exoszómák részt vesznek a tumor mikrokörnyezet és az angiogenezis kialakításában. Prostatadaganat sejtekből kiszabaduló exoszómák TGF- $\beta$ 1 fehérjét tartalmaznak, mely elősegíti a fibroblasztok miofibroblasztá történő differenciálódását. A miofibroblasztok esszenciális szerepet töltenek be a tumor mikrokörnyezet kialakításában és az angiogenezisben (Webber, Steadman et al. 2010). Mivel a rákos sejtek az exoszómák segítségével membrán kötött EGF receptort szállíthatnak endotél sejtekbe, mely hatására az aktiválódott autokrin VEGF/VEGF receptor-2 útvonal angiogenezist vált ki (Al-Nedawi, Meehan et al. 2009). A tumor mikrokörnyezetében minden sejtípus képes exoszóma kibocsátásra a tumor növekedésének kedvező feltételeket létrehozva. Grange és munkatársai kimutatták, hogy a CD105 pozitív vese karcinoma sejtekből (feltételezett tumor őssejtekből) származó exoszómák hatására az aktiválódott endotél sejtek *in vitro* körülmények között (Mátrigélen) kapilláris-szerű struktúrát mutattak. SCID egerekbe oltva a CD105-pozitív sejtekből származó exoszómákat hozzájárultak a pre-metasztatikus környezet kialakításához

az állatok tüdejében azáltal, hogy MMP2, MMP9 és VEGF receptor1-et expresszióját fokozták (Grange, Tapparo et al. 2011). A rákos sejtek között onkogén fehérjék szállíthatnak exoszóma mediálta transzporttal. Vastagbél-daganat esetében megfigyelték, hogy a daganatos sejtekből származó exoszómák mutáns KRAS fehérjét szállítanak. Ezek az exoszómák képesek a vad típusú KRAS proteint expresszáló rákos sejtekbe jutva fokozott sejtosztódást és tumorigenezist előidézni (Demory Beckler, Higginbotham et al. 2013).

Kísérletek bizonyítják, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakításában is szerepet játszanak. A docetaxel rezisztens prosztata sejtvonalból származó exoszómák hatására a kemoterápiás szerre nem rezisztens sejtek is azzá váltak. A rezisztencia kialakulása az exoszómák által hordozott MDR1 receptor átadásával magyarázható (Corcoran, Rani et al. 2012). A melanoma sejtek esetében a ciszplatinnal szembeni rezisztencia, a ciszplatint tartalmazó exoszóma kibocsátással volt magyarázható (Federici, Petrucci et al. 2014).

A daganatos sejtek által kibocsátott exoszómák képesek befolyásolni az immunrendszer működését. A tumor sejtek az immunsejtek toborzásával segítik elő az angiogenezist, a tumor inváziót és a metasztázis képzését egyaránt (Joyce and Pollard 2009). A tüdő tumorból származó exoszómák miRNS tartalma (miR-21 és miR-29a) a makrofágok TLR aktivációján keresztül gyulladásos citokinek termelését váltja ki, ezáltal prometasztikus gyulladásos környezetet létrehozva hozzájárulhatnak a daganat növekedéséhez és a metasztázis képzéséhez (Fabbri, Paone et al. 2012). A daganatos sejtek exoszóma mediálta útvonalon keresztül képesek meggátolni az immunrendszer tumor ellenes hatását. Chalmin és munkatársai kimutatták, hogy a tumor sejtekből származó exoszómák mieloid-eredetű szupresszor sejteket (MDSC) aktiválnak, amelyek T sejtek gátlásán keresztül immunszuppressziót váltanak ki. Az exoszóma-asszociált Hsp72 TLR2/MyD88 függő aktivációt váltott ki a MDSC-ben, amely eredményeként IL-6 termelődését idézte elő megakadályozva az immunrendszer felügyeletét (Chalmin, Ladoire et al. 2010). További vizsgálatok kimutatták, hogy a tumor sejtekből származó exoszómák Fas ligandot tartalmaznak. A Fas ligandot tartalmazó exoszómák immunszuppresszív hatást képesek kiváltani azáltal, hogy apoptózist indukálnak a CD8<sup>+</sup> T limfocitákban (Martinez-Lorenzo, Anel et al. 2004).

Ezen megfigyelések alátámasztják, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák képesek immunszuppresszív környezetet kialakítva támogatni növekedésüket és migrációjukat.



## 4. Célkitűzések

Mivel az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal jelentős szerepet játszik a daganatok kialakulásában: növeli a daganatok invazivitását, fokozza az áttétképzést, továbbá egyik mediátora a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának, munkám első felében a vanillin és kilenc potenciális NF- $\kappa$ B gátló analógjának vizsgálatát tűztük ki célul:

- A vanillin és kilenc aldehid analóg A375 humán melanoma sejtek proliferációjára és NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásainak vizsgálata.
- Vanillinekkel és konvencionális kemoterápiás szerekkel, doxorubicinnel és ciklofoszfamiddal, történő kombinált kezelés vizsgálata melanoma sejteken *in vitro*.
- Az *in vitro* eredmények alapján leghatásosabbnak talált vanillin analógok tumorelles hatásának vizsgálata xenograft modellben.

A daganatok kialakulásának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni rezisztenciájának fontos komponense a tumor-gazda kommunikáció és a megváltozott tumor mikrokörnyezet. Ennek fontos mediátorai a tumorok által kibocsátott exoszómák.

Munkám második felében célul tűztük ki az exoszómák által mediált tumor-gazda kommunikáció alaposabb megismerését.

- Sztenderd protokoll beállítása a B16F1 egér melanoma sejtek által termelt exoszómák izolálására, majd azok karakterizálása.
- Az exoszómák különböző immunsejtekre: dendritikus sejtekre, T limfocitákra és makrofágokra gyakorolt hatásának vizsgálata.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Vegyszerek

Az aldehideket beleértve az *ortho*-vanillint (*o*-vanillin) és a 2,4,6-trihidroxi-benzaldehidet (TBA); a doxorubicin hidrokloridot és a ciklofoszfamidot a SIGMÁtól (St. Louis, MO, USA) vásároltuk. A 4-hidroperoxi-ciklofoszfamidot (4-HC) a Niomech-IIT GmbH német cégtől (Bielefeld, Germany) rendeltük. Az aldehidekből 100 mM-os törzsoldatot készítettünk DMSO-t (Sigma) használva, amelyet 4°C-on tároltunk 4-6 héten keresztül.

A doxorubicin hidrokloridot fiziológiás sóoldatba oldottuk be (10 mM), majd felhasználásig -20°C-on tároltuk. A kísérletek során a törzsoldatból tápfolyadékkal hígítottuk a megfelelő koncentráció elérése érdekében az anyagokat.

Az *in vitro* sejtes esszékben a DMSO (Sigma) koncentráció sosem haladta meg a 0,25%-ot. A ciklofoszfamid és 4-HC oldatot a kezelések előtt frissen készítettük foszfát-pufferelt sóoldat (PBS, Sigma) használatával.

### 5.2 Sejtkultúrák és sejtvonalak

#### 5.2.1 A375 humán melanoma sejtvonal

Az A375 humán melanoma sejtvonalat (American Type Culture Collection, ATCC, Chicago, IL, USA) 10% szérummal (Sigma) kiegészített DMEM-F12 (Lonza, Basel, Switzerland) tápfolyadékban tenyésztettük 37°C-os, 100% párat és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó termosztátban. Az A375 humán melanoma sejtek használatával határoztuk meg a vanillinek és/vagy citosztatikumok toxicitását, majd immundeficiens NSG egerekbe oltva vizsgáltuk az aldehidek és/vagy ciklofoszfamid primér tumor növekedésére gyakorolt hatását (lásd „Állatkísérletek” fejezet).

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az aldehidek és/vagy citosztatikumok NF-κB jelátvitelre gyakorolt hatását, az A375 humán melanoma sejteket pNF-κB-Luc 4 (neo) plazmiddal transzfektáltuk, Lipofectamine 2000 (Invitrogen<sup>TM</sup>) transzfekciós reagens segítségével. A transzfekciós hatékonyság ellenőrzésére pEGFP (zöld fluoreszcens fehérjét kódoló plazmid) plazmidot használtunk. A transzfekciót követő 48 óra elteltével a transzfekciós hatékonyság 78% volt, amelyet áramlási citométer segítségével határoztuk meg (FACS). A transzfekciót követően G418 szelekcióval (200 µg/ml; Sigma) stabil klónokat készítettünk. A

legmagasabb luciferáz aktivitást (NF- $\kappa$ B aktivitást) mutató klónokat felszaporítottuk és lefagyasztottuk. Kísérleteink során a 4. számú klónt használtuk.

### **5.2.2 B16F1 egér melanoma sejtvonal**

A B16F1 sejtvonalat (DTP, DCTP Tumor Repository, Fredrick, MD, USA) Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM, Mediatech Inc., Manassas, USA) tenyésztettük, amelyet 10% hőinaktivált magzati borjú szérummal (FCS, HyClone<sup>TM</sup>, South Logan, USA), 1% MEM nem esszenciális aminosavval, 1% MEM vitaminkészítménnyel és 1% nátrium-piruváttal (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, USA ) egészítettük ki. A sejteket 37°C-os, párás környezetben, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó termosztátban tenyésztettük. A melanoma sejtvonalat exoszóma termeltetésre használtuk.

### **5.2.3 Raw 264.7 és Raw264.7/NF- $\kappa$ B-Luc. egér makrofág sejtvonal**

A Raw264.7/NF- $\kappa$ B-Luc. egér makrofág sejtvonalat korábban Kusz Erzsébet készítette (Eder, Vizler et al. 2009). Kísérleteink során a 12-es, stabilan transzfektált klónt használtuk. Mindkét Raw264.7 sejtvonalat 10% szérummal kiegészített (PAA, Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) DMEM-F12 (Lonza) médiumban tenyésztettük, 37°C-on, maximális páratartalom és 5% CO<sub>2</sub> mellett. A transzfektált sejtek szelekciójához 200  $\mu$ g/ml G418-at használtunk a sejtek közvetlen felolvasztását követően. Munkánk során vizsgáltuk a B16F1 melanoma sejtek által termelt exoszómák hatását a Raw264.7 makrofágok aktivációjára.

### **5.2.4 Primér dendritikus sejtek és CD4<sup>+</sup> T sejtek**

A dendritikus sejteket 8-10 hetes C57BL/6 nőstény egerek comb- és sípcsontjainak csontvelőjéből izoláltuk. Az izolálást követően az éretlen dendritikus sejteket RPMI1640 (Lonza) médiumban tenyésztettük, amelyet 10% FCS-el (PAA), 2 mM glutaminnal, 100 U/ml penicillin/sztreptomycin keverékkel és 20 ng/ml rekombináns egér GM-CSF-el (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) egészítettük ki. Az izolálást követő 6. napon exoszómával (600  $\mu$ g/ml összfehérje tartalom), B16F1 sejt felülúszóval, míg pozitív kontrollként, azaz dendritikus sejt aktivátorként, 100 ng/ml LPS-el kezeltük a sejteket. Funkcionális negatív kontrollként rekombináns RANTES kemokin (1  $\mu$ g/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) kezelést alkalmaztunk.

A CD4<sup>+</sup> T sejteket az R&D Systems által forgalmazott egér T sejt izoláló kit (Mouse T Cell CD4 Subset Column Kit, R&D Systems) segítségével tisztítottuk négy-négy db 8-10 hetes C57BL/6 nőtény egér lépéből. A CD4<sup>+</sup> T sejteket ( $5 \times 10^5$  sejt/lyuk) és az indukált dendritikus sejteket ( $10^4$  sejt/lyuk) U aljú 96 lyukú lemezen 72 órán keresztül együtt inkubáltuk, majd 3H-timidin inkorporációs esszé segítségével határoztuk meg a T sejt proliferációt. A kokultúrához lyukanként 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-timidin hozzáadását követően 18 órán keresztül inkubáltuk a sejteket, majd folyadékszintillációs detektorral (TRI-CARB 210 TR, Packard) mértük a [<sup>3</sup>H]-timidin beépülését.

A maximális T sejt proliferáció elérése érdekében reseptor agonista anti-CD3 és anti-CD28 ellenanyagokkal (2,5-2,5  $\mu$ g/ml, BD Biosciences, San Jose, USA) kezeltük a sejteket. A T sejt proliferáció egy másik kontrolljaként dendritikus sejt médiumot használtunk, amelyhez hasonlítottuk a különböző kezelés hatására kapott proliferációs értékeket.

### 5.3 Luciferáz esszé

Az A375/NF- $\kappa$ B-Luc. (neo) stabilan transzfektált sejteket 96 lyukú „luminoplate”-re (Corning-Costar; Zenon Biotechnology Ltd., Szeged, Hungary) raktuk ki  $3 \times 10^4$  sejt/lyuk/200  $\mu$ l tápfolyadék sűrűségben. A következő napon 10; 5; 2,5; 1,25; 0,65  $\mu$ M doxorubicinnel és az aldehidekkel (250  $\mu$ M) kezeltük a sejteket. Kísérleteink során a doxorubicin mellett egy másik kemoterápiás szer, a ciklofoszfamid *in vitro* aktív formáját 4-HC is vizsgáltuk. Az 50; 25; 12,5; 6,25; és 3,125  $\mu$ M 4-HC-ot 250  $\mu$ M-os aldehyd kezelés mellett, vagy anélkül alkalmaztuk. A kezeléseket követő hat órás inkubáció elteltével lyukanként 200-200  $\mu$ l PBS-sel mostuk, majd lizáltuk (1 x Bright-Glo Cell Culture Lysis reagent, 20-20  $\mu$ l/lyuk; Promega, Madison, WI, USA) a sejteket. A luciferáz szubsztrát hozzáadását követően (Bright-Glo Luciferase Substrat, 20-20  $\mu$ l/lyuk; Promega) luminométer segítségével azonnal mértük az enzimreakció hatására keletkező fényfelvillanásokat (Luminoscan Ascent Scanning Luminometer, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Az enzimreakció során keletkező fotonok száma (a mért luciferáz egység) arányos az NF- $\kappa$ B jelátviteli út aktivitásával.

A Raw/NF- $\kappa$ B-Luc. (neo) makrofágokat  $5 \times 10^5$  sejt/sűrűségben, 200  $\mu$ l tápfolyadékba tettük ki lyukanként egy 96 lyukú átlátszó fenekű, színezett falú „luminoplate”-re (Corning-Costar). Következő nap B16F1 melanomából tisztított exoszómával (600  $\mu$ g/ml összfehérje tartalom) és 100 ng/ml LPS-el (Sigma) indukáltuk azokat. Hat órás inkubációt követően

mostuk és lizáltuk a sejteket, majd szubsztrát hozzáadását követően mértük a luciferáz aktivitást, ahogyan a A375/NF- $\kappa$ B-Luc. sejtek esetében.

#### **5.4 Sejtosztódási esszé**

Az A375 humán melanoma sejteket tripszinezést követően lapos aljú 96 lyukú sejtenyésző lemezre (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) tettük ki  $1 \times 10^4$  sejt sűrűséggel lyukanként, 200-200  $\mu$ l tápfolyadékba. Másnap 10; 5; 2,5; 1,25; 0,65  $\mu$ M doxorubicinnel, vagy 50; 25; 12,5; 6,25; és 3,125  $\mu$ M 4-HC-dal és az aldehidekkel (250  $\mu$ M) való kezelést követően 48 órán keresztül 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 100% páratartalom mellett inkubáltuk a sejteket. Az A375 melanoma sejtek számának változását XTT teszttel határoztuk meg (XTT Cell Proliferation Assay Kit, Apply Cham, Darmstadt, Germany).

#### **5.5 Exoszómák izolálása**

$2 \times 10^7$  B16F1 sejtet 75 cm<sup>2</sup> sejtenyésző flaskában tenyésztettünk. 70% konfluencia elérésekor tápfolyadékot cseréltünk a sejteken. Az ezt követő 2-4. napon gyűjtöttük a felülúszót. Az exoszómatermelés optimumát a melanintermelés mértéke alapján állapítottuk meg; amikor a tápfolyadék színe sötétbarnára/feketére változott, legyűjtöttük a felülúszót. B16F1 sejtek felülúszóját a sejtörmelék kiülepítése érdekében 4°C-on, 3900 x g-n, 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd 0,22  $\mu$ m-es szűrőn (Merck Millipore KGaA, Billerica, MA, USA) átszűrtük. Ezt követően egy órán keresztül ultracentrifugálással (150.000 x g) üleptettük ki az exoszómákat. A pelletet kétszer PBS-sel mostuk, majd DPBS-ben felfuszpendáltuk. Az így kapott exoszómákat felhasználásig -70°C-on tároltuk.

#### **5.6 Az exoszómák strukturális vizsgálata**

Az exoszómák strukturális vizsgálatát atomi erő mikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével határozta meg az MTA-SZBK Biofizika Intézetében Dr. Szegletes Zsolt és Dr. Siklós László. Az atomi erő mikroszkópiás mérés Asylum MFP-3D fejjel és Molecular Force Probe 3D vezérlővel (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) történt, MFP-3D Xop program használatával (IGOR Pro software, version 5.03, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).

## **5.7 Az exoszómák fehérjetartalmának meghatározása**

Az exoszóma preparátumokat az összfehérjetartalom mérése alapján sztenderdizáltuk, a fehérjetartalmat Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg, a leírásnak megfelelően.

## **5.8 Citokinek és kemokinek detektálása „proteome profiler” segítségével**

10<sup>6</sup>/kezelés Raw264.7 egér makrofág sejtet 100 ng/ml LPS-el, 600µg/ml összfehérje tartalmú exoszómával és 20 ng/ml IL-4-el (R&D Systems) kezeltünk. Az LPS kezelés hatására a makrofágok 1-es típusú polarizáltságot, míg az IL-4 kezelés hatására 2-es típusú polarizáltságot mutatnak. Kontrollként tápfolyadékot használtunk. 24 órás inkubációt követően legyűjtöttük a felülúszót. A Raw/264.7 egér makrofágok alapállapotában és indukció hatására termelt különböző citokinek és kemokin expresszióját a Mouse Cytokine Array Panel A (Proteome Profiler Array, R&D Systems) segítségével határoztuk meg, a mellékelt protokoll követésével. A Proteoma Profiler egy multi-dot blot technika, amelyben a kapott pöttyök maximum sűrűségét az ImageJ 1.45s, (NIH, Bethesda, MD, USA) program segítségével határoztuk meg.

## **5.9 Állatok és állatkísérletek**

Kísérleteink során 6-8 hetes immundeficiens hím NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) és immunokompetens Balb/c egereket használtunk. Az NSG egereket a Charles River Hungary-tól, míg a Balb/c egereket az MTA SZBK állatházából vásároltuk. A kísérleteink során az állatokat állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21°C tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és normál rágcsalótáp) tartottuk.

## **5.10 Toxikológiai vizsgálat**

A vanillinek *in vivo* tumorelles hatásának vizsgálatát megelőzően a két kiválasztott aldehiddel toxikológiai kísérletet végeztünk. A kísérlet kivitelezéséhez 6-8 hetes hím Balb/c egereket használtunk. Randomizálást követően hármass csoportokra osztottuk, majd 60 mg/kg *o*-vanillinnel, 60 mg/kg TBA-vel, míg kontrollként PBS-el orálisan kezeltük az

egereket 5 napon keresztül, amelyet két nap szünet követett. Minden nap megmértük az állatok súlyát és megfigyeltük a viselkedésüket, hogy utal-e bármilyen jel betegségre. Három hét elteltével feláldoztuk az állatokat. A belső szerveiken (máj, ves, lép, szív, tüdő) makroszkópikus elváltozás nem volt megfigyelhető. Sem a kezelések során, sem pedig a feldolgozáskor semmilyen jel nem utalt a vanillinek toxicitására.

### 5.11 A375 xenograft modell

Ahhoz, hogy *in vivo* megvizsgáljuk az aldehidek és citosztatikum hatását a primér melanoma növekedésére, hat-nyolc hetes hím NSG egereket használtunk a kísérleteinkben. A kísérletet az SZBK SPF állatházában hajtottuk végre. Minden egér bőre alá  $2 \times 10^6$  A375 humán melanoma sejttel oltottunk 100-100  $\mu$ l szérum-mentes RPMI1640-ben (Lonza). A tumor beadását követő napon randomizáltuk az állatokat majd hat csoportba osztottuk azokat (5-8 állat/csoport). Ciklofoszfamiddal intraperitoneálisan, míg *o*-vanillinnel és TBA-val orálisan kezeltük az egereket. Az aldehideket DMSO-ba oldottuk be, majd PBS-el hígítottuk.

A kezelés a következőképpen zajlott:

- a) 60 mg/ttkg *o*-vanillin,
- b) 60 mg/ttkg *o*-vanillin és 80 mg/ttkg ciklofoszfamid
- c) 60 mg/ttkg TBA
- d) 60 mg/ttkg TBA és 80 mg/ttkg ciklofoszfamid
- e) 80 mg/ttkg ciklofoszfamid
- f) kontroll csoport, amelyben az állatok csak vivőanyagot kaptak.

Az aldehideket az állatok heti 5 alkalommal 200-200  $\mu$ l végtérfogatban orálisan kapták, míg a ciklofoszfamidot 100-100  $\mu$ l végtérfogatban intraperitoneálisan a tumor beadását követő 7. és 14. napon.

A primér tumorok méretét digitális tolómérővel mértük. A primér tumor méretét a következőképpen számoltuk ki: tumor méret ( $\text{mm}^3$ ) =  $D \times d^2$ , ahol  $D$  a tumor hossza, míg  $d$  a tumor szélessége. Etikai okok miatt az állatokat a 20. napon túlaltattuk.

Minden állatkísérlet a nemzetközi (1998. XXVIII; 40/2013) és európai (2010/63/EU) szabályzatnak megfelelően, etikai engedély birtokában végeztük.

## **5.12 Statisztikai analízis**

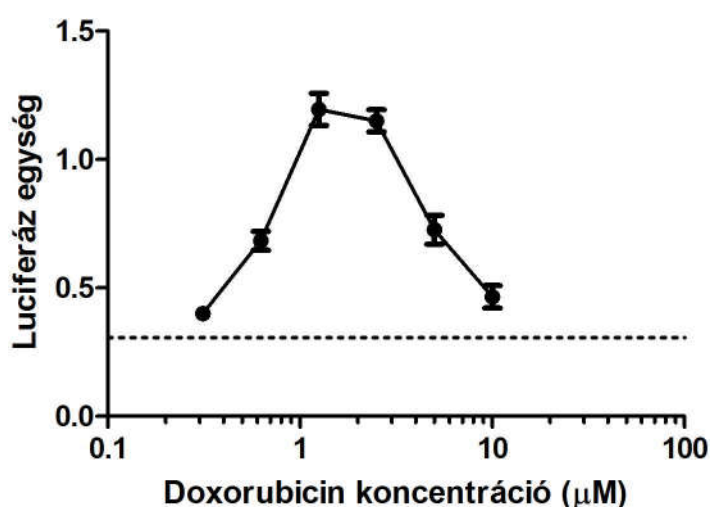
A statisztikai számításokat a GraphPad PRISM szoftver segítségével végeztük. A statisztikai szignifikanciát páros t-próba és többszemponos ANOVA, valamint Bonferroni post-hoc analízissel állapítottuk meg. A különbségeket  $p < 0,05$  esetében tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.



## 6. Eredmények

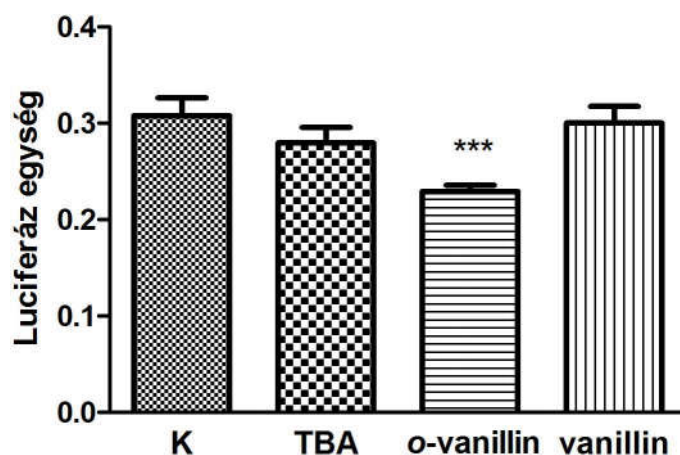
### 6.1 A kiválasztott vanillin analógok gátolják az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal aktivitását és az A375 humán melanoma sejtek proliferációját

Kísérleteink során az NF- $\kappa$ B-Luc. riporter rendszerrel stabilan transzfektált A375 humán melanoma sejteken vizsgáltuk az NF- $\kappa$ B aktivitás változását doxorubicin (10-0.625  $\mu$ M) és aldehid (250  $\mu$ M) kezelés hatására. A kezelést követő hat órás inkubáció elteltével 1,25  $\mu$ M doxorubicin hatására mértük a maximális luciferáz aktivitást, amely majdnem háromszorosa az A375 sejtek alap aktivitásnak (6. ábra). A további kísérletekhez az 1,25  $\mu$ M-os doxorubicin koncentrációt alkalmaztuk. A kísérletek során megvizsgáltuk mind a 10 aldehid A375/NF- $\kappa$ B-Luc. sejtek alap- és 1,25  $\mu$ M-os doxorubicin kezelés hatására megemelkedett NF- $\kappa$ B aktivitásra gyakorolt hatásukat. A mért eredményeket az 1. táblázat utolsó két oszlopában listáztuk.

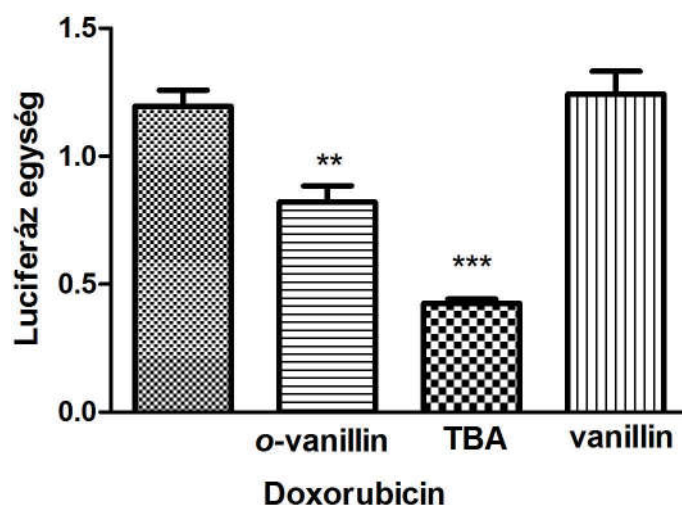


**6. ábra:** Doxorubicin hatása a pNF- $\kappa$ B-Luc. riporter plazmiddal stabilan transzfektált A375 humán melanoma sejtekre. Doxorubicin kezelés hatására aktiválódik az NF- $\kappa$ B jelátviteli út vonal. A luciferáz aktivitás (Y tengely) az NF- $\kappa$ B aktivitással arányos. Az 1,25  $\mu$ M-os doxorubicin koncentráció majdnem háromszorosára növelte a melanoma sejtek alap NF- $\kappa$ B választát ( $p < 0,0001$ ). A szaggatott vonal az A375 sejtek indukció nélküli, alap NF- $\kappa$ B választát mutatja.

A tíz aldehid közül hat (2,4,6-trimetoxi-benzaldehid; 2,4-dihidroxi-benzaldehid; 2-nitro-benzaldehid; TBA; *o*-vanillin; és 3-quinolin-karboxaldehid) a doxorubicinre adott NF- $\kappa$ B választ több mint 20%-ban gátolta. Meglepő módon a vanillin maga nem mutatott ilyen hatást. Kísérleteink során a leghatásosabbnak a vanillin egyik izoformáját, az *o*-vanillint találtuk, amely 62%-kal csökkentette a doxorubicinre adott NF- $\kappa$ B választ (8. ábra). Az *o*-vanillin 250  $\mu$ M-os koncentrációban az A375 sejtek alap NF- $\kappa$ B aktivitását is csökkentette (7. ábra). Az 1,25  $\mu$ M doxorubicinre adott NF- $\kappa$ B választ a leghatékonyabban az *o*-vanillin és a TBA csökkentette (8. Ábra).



**7. ábra: A vanillin, *o*-vanillin és TBA hatása az A375/NF- $\kappa$ B-Luc. sejtek NF- $\kappa$ B válaszára.** Az *o*-vanillin (250  $\mu$ M) szignifikánsan csökkentette a kontroll (K) A375/NF- $\kappa$ B-Luc. sejtek alap NF- $\kappa$ B válaszát ( $***p < 0,0001$ ). A vanillin és a TBA kezelés hatására az A375/NF- $\kappa$ B-Luc. sejtek alap NF- $\kappa$ B válasza szignifikánsan nem változott. Átlag  $\pm$  SEM (n=3)



**8. ábra: Doxorubicin és vanillinek hatása az A375 melanoma sejtek NF-κB aktivitására.** Az 1,25 μM doxorubicin által indukált NF-κB választ szignifikánsan csökkentette a 250 μM TBA ( $p < 0,0020$  a doxorubicinhez képest) és 250 μM *o*-vanillin ( $p < 0,0001$  a doxorubicinhez képest). A 250 μM vanillin nem befolyásolta a sejtek doxorubicinre adott NF-κB választ. Átlag±SEM (n=3)

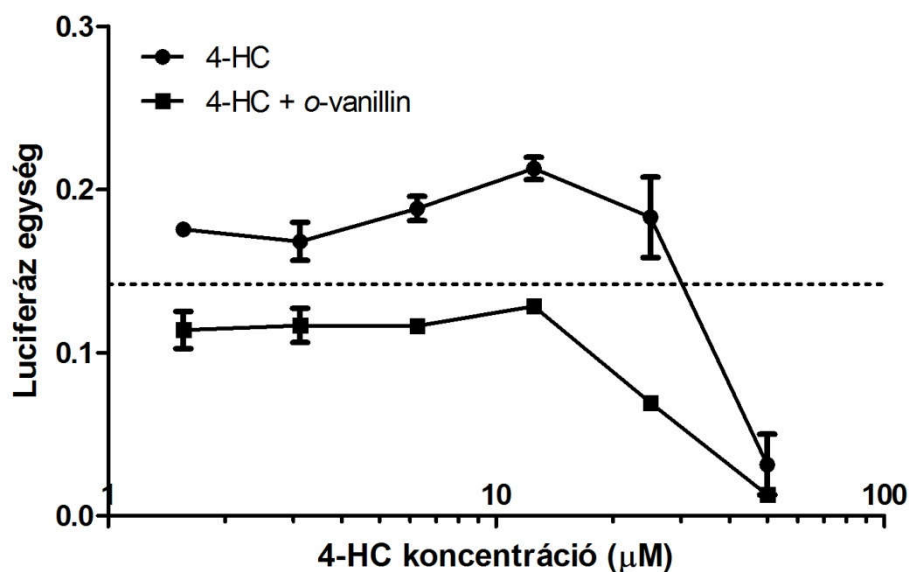
További *in vitro* kísérletek során megvizsgáltuk mind a 10 aromás aldehid és doxorubicin citotoxikus hatását az A375 humán melanoma sejtekre. A vanillineket 250 μM-os koncentrációban alkalmaztuk. 48 órás inkubációt követően mitokondriális enzim által katalizált színreakció segítségével (XTT) határoztuk meg a sejtek proliferációját. A kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. A vizsgált aldehidek közül a leghatásosabban a TBA és *o*-vanillin gátolta az A375 humán melanoma sejtek proliferációját. A két aldehidet 1,25 μM doxorubicinnel együtt alkalmazva a sejtek viabilitása kevesebb, mint 10% volt (1. táblázat). A 1,25 μM doxorubicin kezelés 85%-ban gátolta az A375 humán melanoma sejtek proliferációját.

**1. táblázat:** Vanillin és rokon analógok hatása az A375 melanoma sejtek proliferációjára és NF- $\kappa$ B aktivitására

Név	Szerkezet	Sejt viabilitás a kontrollhoz viszonyítva <sup>#</sup>		NF- $\kappa$ B aktivitás (6 h)	
		Aldehidek jelenlétében (250 $\mu$ M)	Doxorubicin (1.25 $\mu$ M) + aldehidek (250 $\mu$ M) $\S$	Alap aktivitás változása aldehid (250 $\mu$ M) kezelés hatására	Doxorubicin-indukálta aktivitás * változása aldehid (250 $\mu$ M) kezelés hatására
2,4,6-Trimethoxybenzaldehyde		44%	11%	216%	71%
2,5-Dimethoxybenzaldehyde		50%	21%	79%	89%
2,4-Dihydroxybenzaldehyde		83%	25%	87%	53%
4-Nitrobenzaldehyde		84%	22%	99%	91%
2-Nitrobenzaldehyde		38%	14%	82%	44%
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde (TBA)		5%	5%	93%	71%
2-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (o-Vanillin)		17%	10%	76%	35%
4-(Dimethylamino)benzaldehyde		104%	36%	103%	114%
3-Quinolinecarboxaldehyde		77%	30%	79%	61%
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Vanillin)		104%	26%	96%	100%

<sup>#</sup> Az A375 sejtek viabilitása az aldehidek és az aldehidek plusz doxorubicin 48 órás inkubációt követően. A táblázatban feltüntetett adatok 3-5 párhuzamos kísérlet átlagait foglalja össze. <sup>†</sup> Luciferáz aktivitás 6 órás inkubációt követően. \*Doxorubicin koncentráció 1.25  $\mu$ M;  $\S$  A doxorubicin (1.25  $\mu$ M) kezelés 15% sejt viabilitást eredményezett.

Az *o*-vanillin és TBA NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalra gyakorolt hatását egy másik családba tartozó kemoterápiás ágens, az alkiláló ciklofoszfamid (*in vitro* kísérletekben 4-HC) esetében is megvizsgáltuk. A doxorubicinhez hasonlóan a 4-HC szintén aktiválta az NF- $\kappa$ B szignáltranszdukciós útvonalat. Maximális luciferáz aktivációt 12,5  $\mu$ M 4-HC eredményezett, melyet a 250  $\mu$ M-os *o*-vanillin kezelés 43%-al (9. ábra), míg a TBA kezelés 17%-al lecsökkentett.



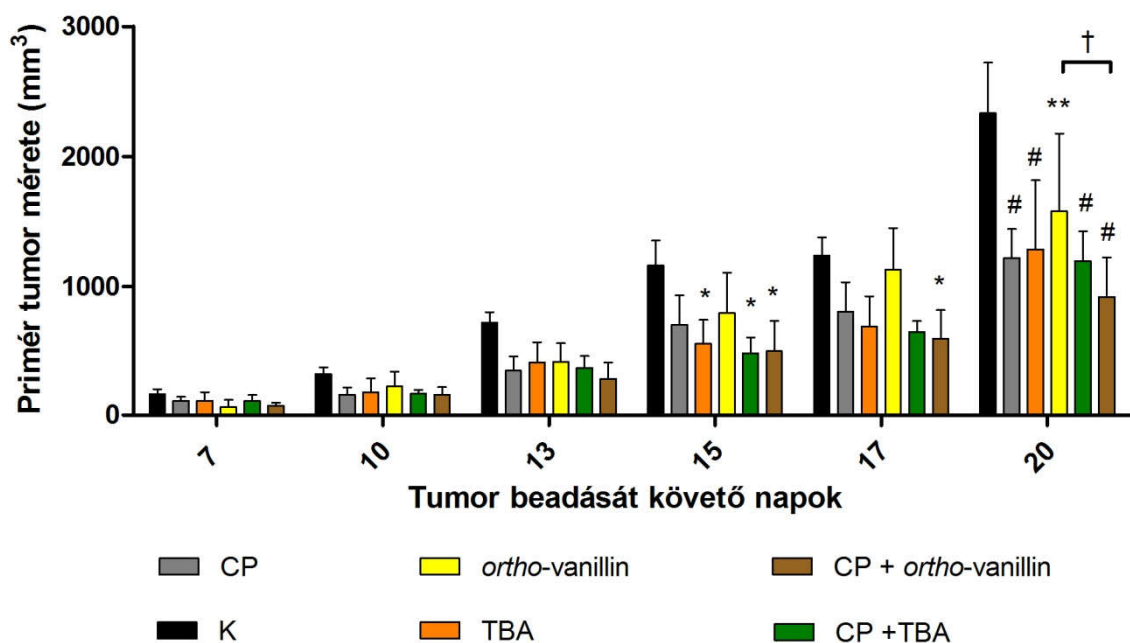
9. ábra: 4-hidroperoxi-ciklofoszfamid (4-HC) hatása az A375/NF-κB-Luc. sejtek NF-κB válaszára. A 4-HC aktiválja az NF-κB jelátviteli útvonalat. A szaggatott vonal az A375 sejtek indukció nélküli, alap NF-κB válaszáat mutatja. A legmagasabb NF-κB választ 12,5 μM 4-HC kezelés váltotta ki, amelyet a 250 μM *o*-vanillin kezelés 43%-al csökkentett. Átlag±SEM (n=3)

## 6.2 Az *ortho*-vanillin és 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid (TBA) terápiás hatással rendelkezik az A375 humán melanoma egér xenograftok esetében

Az *in vitro* kísérletek során leghatékonyabban az *o*-vanillin csökkentette a citosztatikumokra adott NF-κB válasz, míg a sejt proliferációs esszében a TBA bizonyult a leghatásosabb sejtosztódás gátlónak. Az *in vivo* kísérleteink során ezen két aldehyd primér tumor növekedésére gyakorolt hatását vizsgáltuk mind külön, mind ciklofoszfamiddal együtt, kombinációs terápiában.

Klinikai modellt felállítva A375 humán melanoma sejteket oltottunk az NSG egerek bőre alá. A vanillinekkel (60 mg/kg) a tumor beadását követő naptól gyomorszonda segítségével orálisan kezeltük az állatokat 5 napon keresztül, majd két nap szünetet követően még 3x megismételtük az öt napos kezelést. A ciklofoszfamidot (80 mg/kg) intraperitoneálisan alkalmaztuk a tumor beadását követő 7. és 14. napon.

Az *o*-vanillin és TBA monoterápiaként és ciklofoszfamiddal együtt adjuváns terápiaként egyaránt csökkentette az A375 humán melanoma xenograft primér tumor méretét az immundeficiens NSG egerekben (10. ábra).

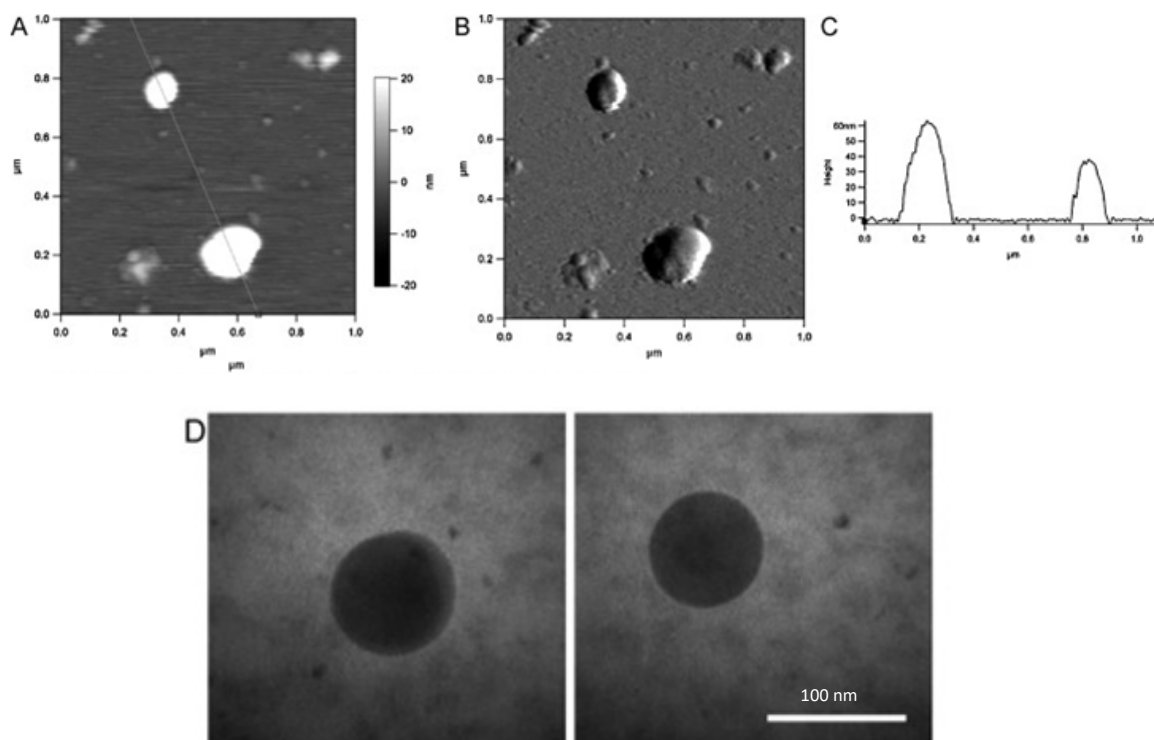


**10. ábra: Az *o*-vanillin, TBA és ciklofoszfamid (CP) kezelés hatása az A375 primér melanoma növekedésére.** A tumort beadását követő 15. napon az *ortho*-vanillin és CP kombinált terápia szignifikánsan csökkentette a primér tumor növekedését, amely szignifikancia a kezelés végéig (20. nap) megmaradt. A tumor beadását követő 20. napon a TBA és *ortho*-vanillin monoterápia és CP-vel együtt alkalmazva szignifikánsnak csökkentette a primér tumor méretét \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,01$  a kontrollhoz képest; † $p < 0,05$  az *ortho*-vanillinhez képest.

Az *o*-vanillin és ciklofoszfamid egyidejűleg alkalmazva már a 15. napon szignifikánsan csökkentette a primér tumor növekedését; a szignifikáns különbség a kezelés végéig (20. nap) megmaradt. A tumor beadását követő 20. napon a TBA és *o*-vanillin monoterápia hatása is szignifikánsnak bizonyult; a TBA 45%-al, míg az *o*-vanillin 32%-al csökkentette a primér tumorok növekedését ( $p < 0,0001$  a kontrollhoz képest). A 20 napon mért adatok statisztikai analízise alapján a ciklofoszfamiddal együtt az *o*-vanillin adjuváns terápiaként hatásosabbnak bizonyult az *o*-vanillin monoterápiával szemben ( $p < 0,05$ ).

### 6.3 A B16 melanoma sejtek exoszómáinak jellemzése

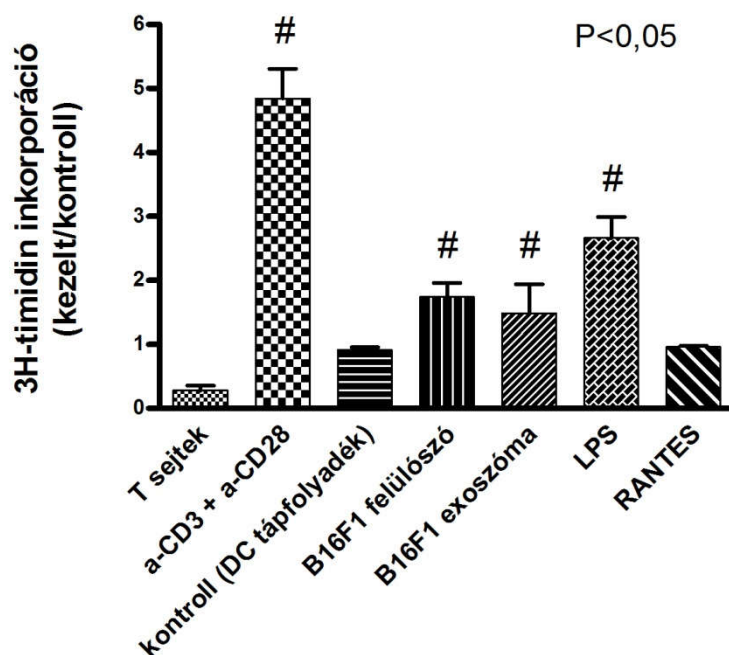
A laboratóriumunkban sztenderd protokollt állítottunk be a B16F1 sejtek felülúszójából történő exoszómák izolálására. Az exoszómákat méretét atomi erő mikroszkópiás felvétel segítségével határoztuk meg. A B16F1 sejtek felülúszójából származó exoszómák mérete 30-70 nm közé esett, amely megfelel az irodalmi adatoknak (11. ábra A, B és C). A képen látható kisebb szemcsék membrán törmelékek. A következő vizsgálatban transzmissziós elektronmikroszkópiát (TEM) végeztünk az exoszómák szerkezetének leírására. A TEM felvételeken (11. ábra C) nem látható belső struktúráltság, homogén felépítésük arra utal, hogy az exoszóma izolátum nem tartalmaz virionokat (11. ábra); ennek kizárása a biológiai hatás interpretálásához fontos.



**11. ábra: A B16F1 melanoma sejtek exoszómákat bocsátanak ki.** A sejt felülúszójából izolált exoszómákat két módszerrel tettük láthatóvá. Az exoszómák méretét atomi erő-mikroszkópia segítségével határoztuk meg (A, B, C). Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel (D) igazoltuk a kettős membrán jelenlétét, és kizártuk a vírusrészecskékkel való szennyezést.

#### 6.4 A melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák a dendritikus sejtek aktivációján keresztül T sejt proliferációt idéznek elő

C57BL/6 egerek csontvelőjéből izolált éretlen dendritikus sejteket exoszómával, B16F1 sejt felülúszóval és pozitív kontrollként 100 ng/ml LPS-el kezeltünk. Negatív kontrollként sejtproliferációt nem indukáló RANTES kemokint (1 µg/ml) alkalmaztunk. Az LPS (100 ng/ml), a B16F1 sejt felülúszó és az exoszóma (600 µg/ml összfehérje tartalom) kezelés hatására aktiválódtak a dendritikus sejtek, amely aktiváció következtében 72 óra elteltével T sejt proliferáció volt mérhető. Maximális proliferációt a T sejt receptor komplexen keresztül ható agonista anti-CD3 és kostimuláló molekulát aktiváló anti-CD28 (2,5-2,5 µg/ml) ellenanyag kezelés hatására mutattak a T sejtek (pozitív T sejt proliferációs kontroll), míg a RANTES (1 µg/ml) kezelés hatására (funkcionális negatív kontroll) nem mutattak szignifikáns osztódást (12. ábra). A kapott proliferációs értékeket a DC médium hatására kapott értékekhez viszonyítottuk.

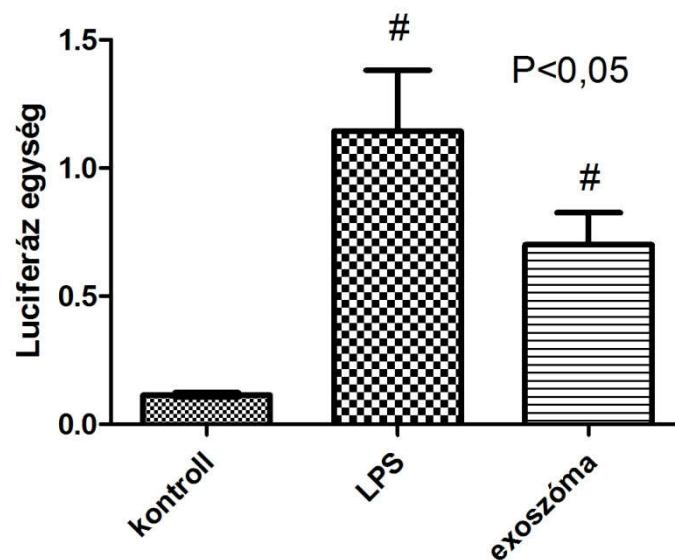


**12. ábra: A melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák dendritikus sejtek aktivációján keresztül T sejt proliferációt váltanak ki.** A dendritikus sejtek exoszóma, B16F1 sejt felülúszó és LPS (100 ng/ml) kezelés hatására aktiválódtak, amely a T sejt proliferáción keresztül volt mérhető. A háttér T sejt proliferációt a kezeletlen T sejtek mutatták, míg a maximális T sejt osztódást anti-CD3 és anti-CD28 (2,5-2,5 µg/ml) ellenanyag kezelésével váltottuk ki. Proliferációt nem indukáló RANTES (1 µg/ml) szolgált funkcionális negatív kontrollként.



### 6.5 A B16F1 melanomából származó exoszómák aktiválják a makrofágok NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalát

A Raw/NF- $\kappa$ B-Luc. 4 makrofágokat exoszómával (600  $\mu$ g/ml összfehérje tartalom) és LPS-el (100 ng/ml) kezeltünk. A pozitív kontrollként használt LPS és az exoszóma kezelés hatására egyaránt megemelkedett luciferáz aktivitást, azaz NF- $\kappa$ B aktivitást mértünk (13. ábra). A kísérlet azt bizonyítja, hogy a B16F1 sejtek által kibocsátott exoszómák makrofág aktivációt eredményeznek.



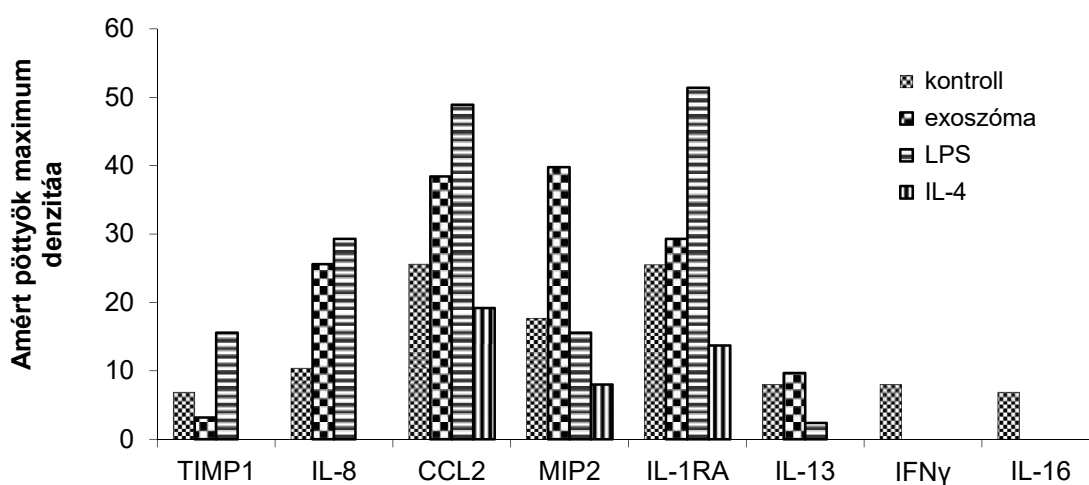
13. ábra: A B16F1 melanomából származó exoszómák aktiválják a makrofágok NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalát. A pozitív kontrollként használt LPS-hez (100 ng/ml) hasonlóan az exoszóma (600  $\mu$ g/ml összfehérje tartalom) kezelés is aktiválta Raw264.7 makrofágokban az NF- $\kappa$ B-Luc.4 reporter gént.

### 6.6 A melanoma sejtek által kibocsátott exoszómák megváltoztatják a makrofágok citokin és kemokin mintázatát

Az exoszóma kezelés hatására aktiválódnak a makrofágok. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy az exoszóma kezelés hatására milyen irányba polarizálódnak a makrofágok, M1 tumor ellenes, vagy M2 tumort támogató irányba, megvizsgáltuk a makrofág specifikus citokin és kemokin mintázatát. Raw264.7 eger makrofág sejteket LPS-el (100 ng/ml), IL-4-el (20 ng/ml) és B16F1 melanomából származó exoszómával (600  $\mu$ g/ml összfehérje tartalom) kezeltük. 24 órás inkubációt követően a felülúszóból Mouse Cytokine Array Panel A (R&D Systems) segítségével határoztuk meg a kezelések hatására termelt citokin és kemokin mintázatot (14.

ábra). Mivel a Raw264.7 egy érett egér makrofág sejtvonal, így a kezeletlen sejtek is rendelkeznek egy alap citokin és kemokin mintázattal.

A vizsgálataink során 40 különböző citokin és kemokin termelődését vizsgáltuk: CXCL13, IL-3, CXCL17, C5a, IL-4, CXCL11, TIMP1, G-CSF, IL-5, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-6, M-CSF, TREM1, CCL-1, IL-7, CCL2, CCL11, IL-10, CCL12, CD54, IL-13, CXCL9, IFN $\gamma$ , IL-12p70, CCL3, IL-1 $\alpha$ , IL-16, CCL4, IL-1 $\beta$ , IL-17, MIP2, IL-1Ra, IL-23, CCL5, IL-2, IL-27 és CXCL12. Az IL-3, CXCL17, CXCL11, IL-5, CCL12, IL10, IL-12p70, IL-2 és CXCL12 citokinek szintje a mérési tartomány alá esett. Az exoszóma kezelés hatására a TIMP1, IFN $\gamma$  és IL-16 szintje lecsökkent, míg az IL-8, CCL2, MIP2 és IL-1Ra szintje megemelkedett a kezeletlen kontrollhoz képest. Az exoszóma kezelés hatására megváltozott citokin és kemokin mintázat nem felelt meg sem a klasszikus LPS (M1-es, tumor ellenes) sem a klasszikus IL-4 (M2-es, tumort támogató) kezelés hatására adott válasznak. Az IL-4 kezelés hatására csökkent a CCL2, IL-1RA és MIP2 szintje, míg exoszóma kezelés hatására megnövekedett. Az LPS hatásával ellentétben, az exoszóma kezelés során az IL-13 és MIP2 szintje is megemelkedett.



**14. ábra:** Az exoszóma kezelés hatására megváltozik a makrofágok által termelt citokin- és kemokin mintázat. A melanoma sejtek által termelt exoszómákkal történő kezelés hatására megnövekedett a MIP-2, IL-8, CCL2, IL-13 és az IL-1RA fehérjék mennyisége, míg a TIMP1, IFN $\gamma$  és az IL-16 mennyisége csökkent a kontrollhoz képest. Az exoszómák hatására termelt citokin és kemokin mintázat eltért mind az LPS, mind az IL-4 kezelés hatására adott mintázattól.

## 7. Megbeszélés

Az NF- $\kappa$ B szignálút szerepét humán melanoma sejtvonalak egy paneljén kezdtük vizsgálni. Előkísérletek után választásunk a leggyakrabban használt humán melanómára, az A375 sejtvonalra esett, mivel egy jól ismert és vizsgált sejtvonal. Az A375 esetében is, akárcsak a primér humán melanoma esetében az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal folyamatosan aktív (Yang and Richmond 2001). Vizsgálatainkat egy széles körben használt citosztatikum, a doxorubicin használatával kezdtük, mivel elterjedtsége mellett a szer további előnyös tulajdonságokkal is rendelkezik: más citosztatikumokhoz képest viszonylag könnyen oldható, emellett nem igényel enzimatis aktivációt (nem prodrug), vagyis *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt alkalmazható. Igazoltuk, hogy a doxorubicin az általunk használt tumormodellben aktiválja az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalat.

Munkánk eredeti hipotézise az volt, hogy a vizsgált aldehidek közül több is rendelkezhet tumorellenes hatással, és ez az NF- $\kappa$ B rendszer gátlásán alapulhat. Az NF- $\kappa$ B szignálút gátlása feltételezésünk szerint két egymást kiegészítő mechanizmuson keresztül gátolhatja a tumor növekedést: 1) közvetlenül a daganatsejtekre hatva gátolhatja a tumor inváziót és áttétképzést; 2) citosztatikumokra is érzékenyítheti a daganatsejteket. Kimutattuk, hogy a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehid, a 2,5-dimetoxi-benzaldehid, a 2-nitro-benzaldehid, a TBA, az *o*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehid citosztatikus hatással rendelkeznek, amelyek közül a leghatásosabban a TBA és az *o*-vanillin gátolta az A375 human melanoma sejtek proliferációját. A doxorubicin kezelés hatására megemelkedett NF- $\kappa$ B választ a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehid, 2,4-dihidroxi-benzaldehid, 2-nitro-benzaldehid, TBA, *o*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehid molekulák hatékonyan csökkentették, amelyek közül a legaktívabbnak szintén az *o*-vanillin bizonyult (1. táblázat). Az *o*-vanillin nem csak a doxorubicin kezelés hatására megemelkedett NF- $\kappa$ B választ csökkentette, hanem az A375 humán melanoma sejtek alap, konstitutív NF- $\kappa$ B aktivitását egyaránt. Érdekes ellentmondás, hogy több korábbi munkával ellentétben mi a vanillint magát nem találtuk aktívnak (Lirdprapamongkol, Sakurai et al. 2005, Lirdprapamongkol, Sakurai et al. 2010); ez talán az általunk használt tumorvonalon múlhat. Kérdést vet fel az NF- $\kappa$ B szerepével kapcsolatban, hogy saját előzetes eredményeink alapján a citosztatikum-kezelés nem minden melanoma vonal esetében emelte az NF- $\kappa$ B szintet (nem bemutatott eredmények). Az általunk használt riporter sejtvonalak öt NF- $\kappa$ B kötőhelyeket tartalmazó, minimál promóteres konstrukciót hordoznak. Ez a rendszer jól használható az NF- $\kappa$ B aktivitás változásainak követésére, de nem méri az „abszolút” NF- $\kappa$ B szintet. Annak vizsgálatát, hogy

a citosztatikumokkal kiváltható NF- $\kappa$ B indukció korrelál-e az NF- $\kappa$ B szignál „abszolút” szintjével az egyes tumor vonalakban, és hogy hogyan viszonyul ez a jelenség a tumor egyéb tulajdonságaihoz – motilitás, invazivitás, kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia – a későbbiekben tervezzük elvégezni.

Vizsgálatainkat a DNS-interkaláló doxorubicinnel kapott eredményeket alapján egy másik vegyületcsaládba, az alkilálók közé tartozó ciklofoszfamiddal folytattuk. Ez a citosztatikum a melanoma kemoterápiájában használt egyes kombinációs kezeléseknek is része. A doxorubicinnel ellentétben a ciklofoszfamid prodrug, ezért *in vitro* kísérletekben egy kémiaiilag módosított származékát, a 4-hidroperoxi-ciklofoszfamidot használtuk, amely spontánul hidrolizálva a hatóanyag aktív formáját hozza létre. A doxorubicinhez hasonlóan ez a kemoterápiás szer is aktiválta az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalat, és az NF- $\kappa$ B szignálút ebben az esetben is gátolható volt az *o*-vanillinnel.

Az *in vitro* kísérletek alapján legígéretesebbnek talált *o*-vanillint és TBA-t választottuk *in vivo* xenograft kísérleteinkhez. Klinikai modellt felállítva A375 humán melanomával oltottunk NSG immundeficiens egereket, majd megvizsgáltuk külön az aldehidek és ciklofoszfamiddal együtt adjuváns terápiaként a primér tumorra gyakorolt hatásukat. Az ciklofoszfamid és *o*-vanillin adjuváns terápia már a tumor beadásától számított 15. napon szignifikánsan csökkentette a primér tumor növekedését, amely szignifikancia a kísérlet végéig megmaradt. Az *o*-vanillin monoterápia a 20. napon eredményezett szignifikáns primér tumor csökkenést. A TBA ciklofoszfamiddal kombinált terápiaként volt hatékony a tumor beadását követő 20 napon, míg monoterápiaként a 15. és 20. napon gátolta jelentős mértékben a primér tumor növekedését. A ciklofoszfamid kezelés csak a 20. napra fejtette ki szignifikáns tumor növekedést gátló hatását.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mind az *o*-vanillin, mind a TBA tumor ellenes hatással rendelkezik *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt.

Az *o*-vanillin esetleges gyógyászati felhasználását megkönnyítheti, hogy a vanillinhez hasonlóan *in vivo* nem toxikus természetes molekula, ami szintén előfordul a „vanília” orchideafajok (*Vanilla planifolia*, *pompona* és *tahitiensis*) termésében. Felhasználását szintén megkönnyítheti, hogy ugyan nem „klasszikus” vanília illatú, illata kellemesnek mondható. Bár nem közvetlenül növényekből izolálható, a TBA szintén előfordulhat az emberi szervezetben, mint az antocianin lebomlási terméke a bélflóra által, ezért toxitása elhanyagolható (Forester and Waterhouse 2008). A TBA-ról nemrég kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között megakadályozza a vastagbél daganatos sejtek

proliferációját, és gátolja a Caco-2 sejtek NF- $\kappa$ B aktivációját azáltal, hogy megakadályozza a DNS-hez való kötődését (Forester, Choy et al. 2014).

Eredményeink gyakorlati szempontból is érdekesek lehetnek: mivel a melanoma kemoterápiája napjainkban sem megoldott, a klinikumban nagy segítséget jelentenének olyan nem toxikus hatóanyagok, amelyekkel a kemoterápia hatékonysága fokozható.

Az exoszómák immunoduláló hatását a laboratóriumunkban elérhető teljesebb módszertani háttér miatt egérmodellben vizsgáltuk, ehhez a leggyakrabban használt egér melanoma vonalat, a B16F1 melanomát választottuk. Első lépésként beállítottunk egy sztenderd protokollt az exoszómák *in vitro* termeltetésére és izolálására, amelyet többszöri differenciál szűrést követően ultracentrifugálással valósítottunk meg. Az exoszóma preparátumok azonosítását, és validálását atomi erő mikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével végeztük. Az irodalmi adatoknak megfelelő eredményt kaptunk, azaz hogy az általunk tisztított exoszómák 20-100 nm-es mérettartományba esnek, és hogy nem mutatnak belső struktúráltságok, amely kizárja a vírus részecskékkal való szennyezettséget. Ezt követően kimutattuk, hogy a melanoma sejtekből származó exoszómák elősegítik a dendritikus sejtek érését, amely hatására T sejt proliferációt következett be. Az általunk kapott eredmények ellentmondanak pár korábban megjelent tanulmánynak, amelyekben arról számolnak be, hogy az exoszómák megakadályozzák a dendritikus sejtek érését, így képtelenek fokozni a tumor ellenes immunitást (Yu, Liu et al. 2007). Vannak olyan tanulmányok is, amelyek arról számolnak be, hogy az exoszómák fokozzák a tumor ellenes immunitást. A tumor sejtek által termelt exoszómák tumor antigéneket hordozva aktiválják a dendritikus sejteket, amelyek antigén specifikus citotoxikus T sejt mediálta tumor ellenes hatást váltanak ki (Yang and Robbins 2011). Multhoff és munkatársai bizonyították, hogy a Hsp70/Bag-4 membrán pozitív hasnyálmirigy és vastagbél daganat sejtekből származó exoszómák fokozzák az NK sejtek migrációját és citotoxikus aktivitását (Gastpar, Gehrmann et al. 2005).

Kísérleteink során az exoszóma kezelés hatására aktiválódott az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal. A makrofágokban aktivált NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal összefüggésbe hozható olyan gének expressziójával (VEGF, IL-6, TNF- $\alpha$ ), amelye szerepet játszanak a tumorigenezisben, rávilágítva a makrofágok tumorigenezisben betöltött szerepére. Mindezen adatok azt sugallják, hogy az exoszóma által indukált NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a rosszindulatú folyamatok kialakulásában.

Az exoszóma indukció a M1 és M2 citokin és kemokin profiltól egyaránt eltérő, alternatív mintázatot mutatott. A TIMP1 mátrix metalloproteináz inhibitor szintjének csökkenése összefüggésbe hozható a metasztázis képzéssel. A csökkent tumor ellenes M1-es immunválaszt tükrözheti az IFN $\gamma$  és IL-16 szintjének csökkenése és az IL-1RA és az IL13 szintjének emelkedése, amelyek jól ismert gátlói az 1-es típusú immunválasznak. A TIMP1 hatása kétoldalú lehet a tumoros folyamatokban. A mátrix metalloproteinázok gátlásán keresztül megakadályozhatja a tumorok invázióját és metasztázis képzését, míg mátrix metalloproteináz-független aktivitása révén hozzájárulhat a tumoros folyamatok ségítéséhez, ilyen például a mitogén és az anti-apoptotikus hatása (Hornebeck, Lambert et al. 2005). A CCL2, IL-8 és MIP-1, amelyek a kísérleteink során magas szinten expresszáldtak, összefüggésbe hozhatók a gyulladásos folyamatok, az angiogenezis, tumorigenezis és a sebgyógyulási folyamatokkal. A MIP-2 és IL8 (CXCL8) kemokinek up-regulációja a melanoma sejtekben konstitutívan aktív NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal hatásának tulajdonítják (Dhawan and Richmond 2002). Mivel azonban olyan kifejezetten anti-tumorális hatású citokin, mint a TNF- $\alpha$  is jelen volt a kísérletes rendszerben, egyértelmű tumortámogató profil felállítása nem lehetséges.

Exoszómákra irányuló vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a B16F1 sejtek által termelt exoszómák hatással vannak az immunrendszer sejtjeire. *In vitro* körülmények között az exoszómák megváltoztatják a dendritikus sejtek és makrofágok funkcióját; T sejt proliferációt és NF- $\kappa$ B aktivációt idéznek elő. A melanoma sejtek által termelt exoszómák hatására a makrofágok citokin és kemokin profilja is megváltozik. Az exoszóma kezelés hatására tumort támogató és a környezettől függően, a tumoros folyamatokat gátló citokinek és kemokinek is kimutathatóak voltak.

Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák immunológiai szempontból aktív résztvevői a daganatos folyamatoknak. A daganatok környezetében, sok tényező miatt, eleve a kettes típusú polarizáltság jellemző. Bár esetünkben, *in vitro* környezetben, kettős arcot mutat az exoszómával kezelt makrofágok citokin és kemokin profilja, az exoszómák a daganatos környezetben nagy valószínűséggel ezt a kettes típusú, vagyis tumortámogató környezetet erősítik. Kijelenthetjük tehát, hogy az exoszómák daganatos mikrokörnyezet többi elemével szorosan kölcsönhatva, aktív szereplőként vesznek részt a tumorok fejlődésének különböző szakaszaiban.

## Konklúzió

Humán melanoma sejteken a két különböző családba tartozó kemoterápiás szer, a DNS-interkaláló doxorubicin és az alkiláló ciklofoszfamid egyaránt NF- $\kappa$ B aktivációt idézett elő. Az NF- $\kappa$ B aktivitás több vanillin analóggal is csökkenthető volt, ezek közül a legígéretebbnek az *ortho*-vanillin és a 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd (TBA) tűnt. NF- $\kappa$ B gátló hatásuk mellett mindkét molekula gátolta a tumor növekedést is, mind *in vitro*, mind *in vivo*. Mindezek alapján a vanillin analógok ígéretes hatóanyagok, amelyek további vizsgálata indokolt.

A melanóma sejtekből származó exoszómák segítik a dendritikus sejtek érését, ezáltal megnövekedett T sejt proliferációt váltanak ki. Képesek aktiválni a makrofágokat, ami NF- $\kappa$ B aktivációval jár. Az exoszómával kezelt makrofágok citokin/kemokin mintázata határozott immunológiai aktivitást mutat és egyaránt eltér a lipopoliszachariddal és interleukin-4-gyel kezelt sejtek mintázatától. Az melanoma sejtek által termelt exoszómák komplex és egyedi immunmoduláló hatással rendelkeznek. Eredményeink alapján diagnosztikai markerként vagy terápiás célpontként is javasolhatóak.

## 8. Irodalomjegyzék

**Abraham, D. J.,** A. S. Mehanna, F. C. Wireko, J. Whitney, R. P. Thomas and E. P. Orringer (1991). "Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia." Blood **77**(6): 1334-1341.

**Abraham, E.** (2000). "NF-kappaB activation." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N100-104.

**Al-Nedawi, K.,** B. Meehan, R. S. Kerbel, A. C. Allison and J. Rak (2009). "Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 3794-3799.

**Al-Nedawi, K.,** B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha and J. Rak (2008). "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells." Nat Cell Biol **10**(5): 619-624.

**Amiri, K. I.,** L. W. Horton, B. J. LaFleur, J. A. Sosman and A. Richmond (2004). "Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma." Cancer Res **64**(14): 4912-4918.

**Amiri, K. I.** and A. Richmond (2005). "Role of nuclear factor-kappa B in melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 301-313.

**Baldwin, A. S.** (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB." J Clin Invest **107**(3): 241-246.

**Bandarchi, B.,** L. Ma, R. Navab, A. Seth and G. Rasty (2010). "From melanocyte to metastatic malignant melanoma." Dermatol Res Pract **2010**.

**Banerji, A.,** J. Chakrabarti, A. Mitra and A. Chatterjee (2004). "Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells." Cancer Lett **211**(2): 235-242.

**Basseres, D. S.** and A. S. Baldwin (2006). "Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression." Oncogene **25**(51): 6817-6830.  
**Beaudry, F.,** A. Ross, P. P. Lema and P. Vachon (2010). "Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain." Phytother Res **24**(4): 525-530.

**Biswas, S. K.** and C. E. Lewis (2010). "NF-kappaB as a central regulator of macrophage function in tumors." J Leukoc Biol **88**(5): 877-884.

**Blanchard, N.,** D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo and C. Hivroz (2002). "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**(7): 3235-3241.



**Bours, V.,** E. Dejardin, F. Goujon-Letawe, M. P. Merville and V. Castronovo (1994). "The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines." Biochem Pharmacol **47**(1): 145-149.

**Burke, J. R.,** M. A. Pattoli, K. R. Gregor, P. J. Brassil, J. F. MacMaster, K. W. McIntyre, X. Yang, V. S. Iotzova, W. Clarke, J. Strnad, Y. Qiu and F. C. Zusi (2003). "BMS-345541 is a highly selective inhibitor of I kappa B kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-kappa B-dependent transcription in mice." J Biol Chem **278**(3): 1450-1456.

**Caamano, J.** and C. A. Hunter (2002). "NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions." Clin Microbiol Rev **15**(3): 414-429.  
**Carding, S. R.** and P. J. Egan (2002). "Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity." Nat Rev Immunol **2**(5): 336-345.

**Chalmin, F.,** S. Ladoire, G. Mignot, J. Vincent, M. Bruchard, J. P. Remy-Martin, W. Boireau, A. Rouleau, B. Simon, D. Lanneau, A. De Thonel, G. Multhoff, A. Hamman, F. Martin, B. Chauffert, E. Solary, L. Zitvogel, C. Garrido, B. Ryffel, C. Borg, L. Apetoh, C. Rebe and F. Ghiringhelli (2010). "Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells." J Clin Invest **120**(2): 457-471.

**Ciravolo, V.,** V. Huber, G. C. Ghedini, E. Venturelli, F. Bianchi, M. Campiglio, D. Morelli, A. Villa, P. Della Mina, S. Menard, P. Filipazzi, L. Rivoltini, E. Tagliabue and S. M. Pupa (2012). "Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy." J Cell Physiol **227**(2): 658-667.

**Clayton, A.,** A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M. D. Mason and M. B. Hallett (2004). "Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins." FASEB J **18**(9): 977-979.

**Corcoran, C.,** S. Rani, K. O'Brien, A. O'Neill, M. Prencipe, R. Sheikh, G. Webb, R. McDermott, W. Watson, J. Crown and L. O'Driscoll (2012). "Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes." PLoS One **7**(12): e50999.

**Croft, M.,** L. Carter, S. L. Swain and R. W. Dutton (1994). "Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles." J Exp Med **180**(5): 1715-1728.

**Das, K. C.** and C. W. White (1997). "Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C." J Biol Chem **272**(23): 14914-14920.

**Demory Beckler, M.,** J. N. Higginbotham, J. L. Franklin, A. J. Ham, P. J. Halvey, I. E. Imasuen, C. Whitwell, M. Li, D. C. Liebler and R. J. Coffey (2013). "Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS." Mol Cell Proteomics **12**(2): 343-355.

**DeNardo, D. G.,** J. B. Barreto, P. Andreu, L. Vazquez, D. Tawfik, N. Kolhatkar and L. M. Coussens (2009). "CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages." Cancer Cell **16**(2): 91-102.

**DeNardo, D. G.,** M. Johansson and L. M. Coussens (2008). "Immune cells as mediators of solid tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **27**(1): 11-18.

**DeVita, V. T., Jr.** and E. Chu (2008). "A history of cancer chemotherapy." Cancer Res **68**(21): 8643-8653.

**Dhawan, P.** and A. Richmond (2002). "A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells." J Biol Chem **277**(10): 7920-7928.

**Dhawan, P.** and A. Richmond (2002). "Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma." J Leukoc Biol **72**(1): 9-18.

**Dunn, G. P.,** L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-148.

**Durant, S.** and P. Karran (2003). "Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors." Nucleic Acids Res **31**(19): 5501-5512.

**Eder, K.,** C. Vizler, E. Kusz, I. Karcagi, H. Glavinas, G. E. Balogh, L. Vigh, E. Duda and Z. Gyorfy (2009). "The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun **389**(1): 46-51.

**Escarcega, R. O.,** S. Fuentes-Alexandro, M. Garcia-Carrasco, A. Gatica and A. Zamora (2007). "The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(2): 154-161.

**Fabbri, M.,** A. Paone, F. Calore, R. Galli, E. Gaudio, R. Santhanam, F. Lovat, P. Fadda, C. Mao, G. J. Nuovo, N. Zanesi, M. Crawford, G. H. Ozer, D. Wernicke, H. Alder, M. A. Caligiuri, P. Nana-Sinkam, D. Perrotti and C. M. Croce (2012). "MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(31): E2110-2116.

**Federici, C.,** F. Petrucci, S. Caimi, A. Cesolini, M. Logozzi, M. Borghi, S. D'Ilio, L. Lugini, N. Violante, T. Azzarito, C. Majorani, D. Brambilla and S. Fais (2014). "Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin." PLoS One **9**(2): e88193.

**Fitzgerald, D. J.,** M. Stratford, M. J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos and A. Narbad (2004). "Mode of antimicrobial action of vanillin against Escherichia coli, Lactobacillus plantarum and Listeria innocua." J Appl Microbiol **97**(1): 104-113.

**Forester, S. C.,** Y. Y. Choy, A. L. Waterhouse and P. I. Oteiza (2014). "The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals." Mol Carcinog **53**(6): 432-439.

**Forester, S. C.** and A. L. Waterhouse (2008). "Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites." J Agric Food Chem **56**(19): 9299-9304.

**Fujioka, S.,** K. Son, S. Onda, C. Schmidt, G. M. Scrabas, T. Okamoto, T. Fujita, P. J. Chiao and K. Yanaga (2012). "Desensitization of NFkappaB for overcoming chemoresistance of pancreatic cancer cells to TNF-alpha or paclitaxel." Anticancer Res **32**(11): 4813-4821.

**Gajewski, T. F.,** H. Schreiber and Y. X. Fu (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." Nat Immunol **14**(10): 1014-1022.

**Gastpar, R.,** M. Gehrman, M. A. Bausero, A. Asea, C. Gross, J. A. Schroeder and G. Multhoff (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." Cancer Res **65**(12): 5238-5247.

**Godfrey, D. I.** and S. P. Berzins (2007). "Control points in NKT-cell development." Nat Rev Immunol **7**(7): 505-518.

**Grange, C.,** M. Tapparo, F. Collino, L. Vitillo, C. Damasco, M. C. Deregibus, C. Tetta, B. Bussolati and G. Camussi (2011). "Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche." Cancer Res **71**(15): 5346-5356.

**Gustafson, D. L.,** H. R. Franz, A. M. Ueno, C. J. Smith, D. J. Doolittle and C. A. Waldren (2000). "Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, N-methyl-N-nitrosoguanidine and mitomycin C but not (137)Cs gamma-radiation at the CD59 locus in human-hamster hybrid A(L) cells." Mutagenesis **15**(3): 207-213.

**Hagemann, T.,** J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N. F. Li, A. Pluddemann, K. Charles, S. Gordon and F. R. Balkwill (2006). "Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype." J Immunol **176**(8): 5023-5032.

**Hallam, S.,** M. Escorcio-Correia, R. Soper, A. Schultheiss and T. Hagemann (2009). "Activated macrophages in the tumour microenvironment-dancing to the tune of TLR and NF-kappaB." J Pathol **219**(2): 143-152.

**Hanahan, D.** and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.  
Hayakawa, Y., V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H. G. Ljunggren, M. J. Smyth and B. J. Chambers (2004). "NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy." J Immunol **172**(1): 123-129.

**Henze, A. T.** and M. Mazzone (2016). "The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages." J Clin Invest.

**Hong, B. S.,** J. H. Cho, H. Kim, E. J. Choi, S. Rho, J. Kim, J. H. Kim, D. S. Choi, Y. K. Kim, D. Hwang and Y. S. Gho (2009). "Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells." BMC Genomics **10**: 556.

**Hornebeck, W.,** E. Lambert, E. Petitfrere and P. Bernard (2005). "Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression." Biochimie **87**(3-4): 377-383.

**Hu, X.** and L. B. Ivashkiv (2009). "Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases." Immunity **31**(4): 539-550.

**Ianaro, A.,** M. Tersigni, G. Belardo, S. Di Martino, M. Napolitano, G. Palmieri, M. Sini, A. De Maio, M. Ombra, G. Gentilcore, M. Capone, M. Ascierto, R. A. Satriano, B. Farina, M. Faraone-Mennella, P. A. Ascierto and A. Ialenti (2009). "NEMO-binding domain peptide inhibits proliferation of human melanoma cells." Cancer Lett **274**(2): 331-336.

**Ilkovitch, D.** and D. M. Lopez (2008). "Immune modulation by melanoma-derived factors." Exp Dermatol **17**(12): 977-985.

**Jang, S.** and M. B. Atkins (2013). "Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma?" Lancet Oncol **14**(2): e60-69.

**Johansson, M.,** D. G. Denardo and L. M. Coussens (2008). "Polarized immune responses differentially regulate cancer development." Immunol Rev **222**: 145-154.

**Johnstone, R. M.,** M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr and C. Turbide (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem **262**(19): 9412-9420.

**Joyce, J. A.** and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.

**Juhasz, K.,** A. M. Lipp, B. Nimmervoll, A. Sonnleitner, J. Hesse, T. Haselgruebler and Z. Balogi (2013). "The complex function of hsp70 in metastatic cancer." Cancers (Basel) **6**(1): 42-66.

**Kahlert, C.** and R. Kalluri (2013). "Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis." J Mol Med (Berl) **91**(4): 431-437.

**Kayagaki, N.,** M. T. Wong, I. B. Stowe, S. R. Ramani, L. C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W. P. Lee, A. Muszynski, L. S. Forsberg, R. W. Carlson and V. M. Dixit (2013). "Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4." Science **341**(6151): 1246-1249.

**Keifer, J. A.,** D. C. Guttridge, B. P. Ashburner and A. S. Baldwin, Jr. (2001). "Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity." J Biol Chem **276**(25): 22382-22387.

**King, A. A.,** D. T. Shaughnessy, K. Mure, J. Leszczynska, W. O. Ward, D. M. Umbach, Z. Xu, D. Ducharme, J. A. Taylor, D. M. Demarini and C. B. Klein (2007). "Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair." Mutat Res **616**(1-2): 60-69.

**Kogure, T.,** W. L. Lin, I. K. Yan, C. Braconi and T. Patel (2011). "Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth." Hepatology **54**(4): 1237-1248.

- Kryczek, I.,** S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan and W. Zou (2009). "Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis." Blood **114**(2): 357-359.
- Kumar, S. S.,** K. I. Priyadarsini and K. B. Sainis (2004). "Inhibition of peroxynitrite-mediated reactions by vanillin." J Agric Food Chem **52**(1): 139-145.
- Langowski, J. L.,** R. A. Kastelein and M. Oft (2007). "Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance." Trends Immunol **28**(5): 207-212.
- Liang, J. A.,** S. L. Wu, H. Y. Lo, C. Y. Hsiang and T. Y. Ho (2009). "Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells." Mol Pharmacol **75**(1): 151-157.
- Lin, W. W.** and M. Karin (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." J Clin Invest **117**(5): 1175-1183.
- Lirdprapamongkol, K.,** H. Sakurai, N. Kawasaki, M. K. Choo, Y. Saitoh, Y. Aozuka, P. Singhirunnusorn, S. Ruchirawat, J. Svasti and I. Saiki (2005). "Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells." Eur J Pharm Sci **25**(1): 57-65.
- Lirdprapamongkol, K.,** H. Sakurai, S. Suzuki, K. Koizumi, O. Prangsaengtong, A. Viriyaroj, S. Ruchirawat, J. Svasti and I. Saiki (2010). "Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through inhibition of NF-kappaB activation." In Vivo **24**(4): 501-506.
- Liu, J.,** K. G. Suresh Kumar, D. Yu, S. A. Molton, M. McMahon, M. Herlyn, A. Thomas-Tikhonenko and S. Y. Fuchs (2007). "Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells." Oncogene **26**(13): 1954-1958.
- Lu, L.** and H. Cantor (2008). "Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells." Cell Mol Immunol **5**(6): 401-406.
- Lv, L. H.,** Y. L. Wan, Y. Lin, W. Zhang, M. Yang, G. L. Li, H. M. Lin, C. Z. Shang, Y. J. Chen and J. Min (2012). "Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro." J Biol Chem **287**(19): 15874-15885.
- Madonna, G.,** C. D. Ullman, G. Gentilcore, G. Palmieri and P. A. Ascierto (2012). "NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma." J Transl Med **10**: 53.
- Makarov, S. S.** (2000). "NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances." Mol Med Today **6**(11): 441-448.
- Mantovani, A.,** S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena and A. Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11): 549-555.
- Martinez-Lorenzo, M. J.,** A. Anel, M. A. Alava, A. Pineiro, J. Naval, P. Lasier and L. Larrad (2004). "The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack." Exp Cell Res **295**(2): 315-329.

**Martinez, F. O.** and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.

**Mathivanan, S.,** H. Ji and R. J. Simpson (2010). "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." J Proteomics **73**(10): 1907-1920.

**McCarter, M. D.,** J. Baumgartner, G. A. Escobar, D. Richter, K. Lewis, W. Robinson, C. Wilson, B. E. Palmer and R. Gonzalez (2007). "Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients." Ann Surg Oncol **14**(10): 2854-2860.

**McNulty, S. E.,** R. del Rosario, D. Cen, F. L. Meyskens, Jr. and S. Yang (2004). "Comparative expression of NFkappaB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies." Pigment Cell Res **17**(2): 173-180.

**McNulty, S. E.,** N. B. Tohidian and F. L. Meyskens, Jr. (2001). "RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B." Pigment Cell Res **14**(6): 456-465.

**Mears, R.,** R. A. Craven, S. Hanrahan, N. Totty, C. Upton, S. L. Young, P. Patel, P. J. Selby and R. E. Banks (2004). "Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry." Proteomics **4**(12): 4019-4031.

**Milane, L.,** A. Singh, G. Mattheolabakis, M. Suresh and M. M. Amiji (2015). "Exosome mediated communication within the tumor microenvironment." J Control Release **219**: 278-294.

**Mitchell, S.,** J. Vargas and A. Hoffmann (2016). "Signaling via the NFkappaB system." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **8**(3): 227-241.

**Mitsiades, C. S.,** N. Mitsiades, V. Poulaki, R. Schlossman, M. Akiyama, D. Chauhan, T. Hideshima, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson and K. C. Anderson (2002). "Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications." Oncogene **21**(37): 5673-5683.

**Miyahara, Y.,** K. Odunsi, W. Chen, G. Peng, J. Matsuzaki and R. F. Wang (2008). "Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15505-15510.

**Murakami, Y.,** A. Hirata, S. Ito, M. Shoji, S. Tanaka, T. Yasui, M. Machino and S. Fujisawa (2007). "Re-evaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide." Anticancer Res **27**(2): 801-807.

**Muranski, P.,** A. Boni, P. A. Antony, L. Cassard, K. R. Irvine, A. Kaiser, C. M. Paulos, D. C. Palmer, C. E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C. S. Hinrichs, K. W. Kerstann, L. Feigenbaum, C. C. Chan and N. P. Restifo (2008). "Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma." Blood **112**(2): 362-373.

**Nam, J. S.,** M. Terabe, M. J. Kang, H. Chae, N. Voong, Y. A. Yang, A. Laurence, A. Michalowska, M. Mamura, S. Lonning, J. A. Berzofsky and L. M. Wakefield (2008). "Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17." Cancer Res **68**(10): 3915-3923.

**Nasr, R.,** M. E. El-Sabban, J. A. Karam, G. Dbaiibo, Y. Kfoury, B. Arnulf, Y. Lepelletier, F. Bex, H. de The, O. Hermine and A. Bazarbachi (2005). "Efficacy and mechanism of action of the proteasome inhibitor PS-341 in T-cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma." Oncogene **24**(3): 419-430.

**Nesbit, M.,** H. Schaider, T. H. Miller and M. Herlyn (2001). "Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells." J Immunol **166**(11): 6483-6490.

**Ostrand-Rosenberg, S.** (2008). "Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity." Curr Opin Genet Dev **18**(1): 11-18.

**Panahi, Y.,** B. Darvishi, M. Ghanei, N. Jowzi, F. Beiraghdar and B. S. Varnamkhasti (2016). "Molecular mechanisms of curcumins suppressing effects on tumorigenesis, angiogenesis and metastasis, focusing on NF-kappaB pathway." Cytokine Growth Factor Rev **28**: 21-29.

**Park, J. E.,** H. S. Tan, A. Datta, R. C. Lai, H. Zhang, W. Meng, S. K. Lim and S. K. Sze (2010). "Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes." Mol Cell Proteomics **9**(6): 1085-1099.

**Park, S. H.,** Y. B. Sim, S. M. Choi, Y. J. Seo, M. S. Kwon, J. K. Lee and H. W. Suh (2009). "Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered vanillin in the mice." Arch Pharm Res **32**(11): 1643-1649.

**Parolini, I.,** C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Mito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo and S. Fais (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." J Biol Chem **284**(49): 34211-34222.

**Rabinovich, B. A.,** J. Li, J. Shannon, R. Hurren, J. Chalupny, D. Cosman and R. G. Miller (2003). "Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells." J Immunol **170**(7): 3572-3576.

**Rajkumar, S. V.** (2003). "Thalidomide in newly diagnosed multiple myeloma and overview of experience in smoldering/indolent disease." Semin Hematol **40**(4 Suppl 4): 17-22.

**Richardson, P. G.,** T. Hideshima, C. Mitsiades and K. Anderson (2004). "Proteasome inhibition in hematologic malignancies." Ann Med **36**(4): 304-314.

**Riches, A.,** E. Campbell, E. Borger and S. Powis (2014). "Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway." Eur J Cancer **50**(5): 1025-1034.

**Robe, P. A.,** M. Bentires-Alj, M. Bonif, B. Rogister, M. Deprez, H. Haddada, M. T. Khac, O. Jolois, K. Erkmen, M. P. Merville, P. M. Black and V. Bours (2004). "In vitro and in vivo

activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas." Clin Cancer Res **10**(16): 5595-5603.

**Roca, H.**, Z. S. Varsos, S. Sud, M. J. Craig, C. Ying and K. J. Pienta (2009). "CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b<sup>+</sup> peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization." J Biol Chem **284**(49): 34342-34354.

**Ruffell, B.**, D. G. DeNardo, N. I. Affara and L. M. Coussens (2010). "Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity." Cytokine Growth Factor Rev **21**(1): 3-10.

**Schreiber, M. M.**, T. E. Moon and P. D. Bozzo (1984). "Chronic solar ultraviolet damage associated with malignant melanoma of the skin." J Am Acad Dermatol **10**(5 Pt 1): 755-759.

**Sen, R.** and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-928.

**Sfanos, K. S.**, T. C. Bruno, C. H. Maris, L. Xu, C. J. Thoburn, A. M. DeMarzo, A. K. Meeker, W. B. Isaacs and C. G. Drake (2008). "Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing." Clin Cancer Res **14**(11): 3254-3261.

**Sharma, S.**, L. Zhu, S. C. Yang, L. Zhang, J. Lin, S. Hillinger, B. Gardner, K. Reckamp, R. M. Strieter, M. Huang, R. K. Batra and S. M. Dubinett (2005). "Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-gamma-dependent enhancement of antitumor responses." J Immunol **175**(2): 813-819.

**Shattuck-Brandt, R. L.** and A. Richmond (1997). "Enhanced degradation of I-kappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells." Cancer Res **57**(14): 3032-3039.

**Shaughnessy, D. T.**, R. M. Schaaper, D. M. Umbach and D. M. DeMarini (2006). "Inhibition of spontaneous mutagenesis by vanillin and cinnamaldehyde in Escherichia coli: Dependence on recombinational repair." Mutat Res **602**(1-2): 54-64.

**Shaughnessy, D. T.**, R. W. Setzer and D. M. DeMarini (2001). "The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in Salmonella TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites." Mutat Res **480-481**: 55-69.

**Shen, H. M.** and V. Tergaonkar (2009). "NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy." Apoptosis **14**(4): 348-363.

**Shishodia, S.**, D. Koul and B. B. Aggarwal (2004). "Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis." J Immunol **173**(3): 2011-2022.

**Sica, A.**, P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M. G. Totaro, M. Rimoldi, S. K. Biswas, P. Allavena and A. Mantovani (2008). "Macrophage polarization in tumour progression." Semin Cancer Biol **18**(5): 349-355.



- Simpson, R. J.**, J. W. Lim, R. L. Moritz and S. Mathivanan (2009). "Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential." Expert Rev Proteomics **6**(3): 267-283.
- Sinha, P.**, V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda and S. Ostrand-Rosenberg (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol **179**(2): 977-983.
- Smyth, M. J.**, N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2001). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." Int Immunol **13**(4): 459-463.
- Sovak, M. A.**, R. E. Bellas, D. W. Kim, G. J. Zanieski, A. E. Rogers, A. M. Traish and G. E. Sonenshein (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer." J Clin Invest **100**(12): 2952-2960.
- Stoorvogel, W.**, M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze and G. Raposo (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." Traffic **3**(5): 321-330.
- Tang, T.**, R. Eldabaje and L. Yang (2016). "Current Status of Biological Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma." Anticancer Res **36**(7): 3229-3241.
- Tergaonkar, V.**, V. Bottero, M. Ikawa, Q. Li and I. M. Verma (2003). "IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy." Mol Cell Biol **23**(22): 8070-8083.
- Thery, C.**, L. Zitvogel and S. Amigorena (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-579.
- Tlsty, T. D.** and L. M. Coussens (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development." Annu Rev Pathol **1**: 119-150.
- Trajkovic, K.**, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger and M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.
- Trams, E. G.**, C. J. Lauter, N. Salem, Jr. and U. Heine (1981). "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles." Biochim Biophys Acta **645**(1): 63-70.
- Turley, S. J.**, V. Cremasco and J. L. Astarita (2015). "Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment." Nat Rev Immunol **15**(11): 669-682.
- Valadi, H.**, K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.
- van der Bruggen, P.**, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-1647.
- Wakabayashi, O.**, K. Yamazaki, S. Oizumi, F. Hommura, I. Kinoshita, S. Ogura, H. Dosaka-Akita and M. Nishimura (2003). "CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells

in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers." Cancer Sci **94**(11): 1003-1009.

**Wang, W.**, J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, L. Larry, K. R. Cleary and P. J. Chiao (1999). "The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells." Clin Cancer Res **5**(1): 119-127.

**Webber, J.**, R. Steadman, M. D. Mason, Z. Tabi and A. Clayton (2010). "Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation." Cancer Res **70**(23): 9621-9630.

**Whiteman, D. C.** and A. C. Green (1999). "Melanoma and sun exposure: where are we now?" Int J Dermatol **38**(7): 481-489.

**Wilson, C. B.**, E. Rowell and M. Sekimata (2009). "Epigenetic control of T-helper-cell differentiation." Nat Rev Immunol **9**(2): 91-105.

**Wu, S. L.**, J. C. Chen, C. C. Li, H. Y. Lo, T. Y. Ho and C. Y. Hsiang (2009). "Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice." J Pharmacol Exp Ther **330**(2): 370-376.

**Yang, C.** and P. D. Robbins (2011). "The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis." Clin Dev Immunol **2011**: 842849.

**Yang, J.**, K. I. Amiri, J. R. Burke, J. A. Schmid and A. Richmond (2006). "BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 950-960.

**Yang, J.** and A. Richmond (2001). "Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells." Cancer Res **61**(12): 4901-4909.

**Yin, D.**, H. Zhou, T. Kumagai, G. Liu, J. M. Ong, K. L. Black and H. P. Koeffler (2005). "Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM)." Oncogene **24**(3): 344-354.

**Yu, S.**, C. Liu, K. Su, J. Wang, Y. Liu, L. Zhang, C. Li, Y. Cong, R. Kimberly, W. E. Grizzle, C. Falkson and H. G. Zhang (2007). "Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells." J Immunol **178**(11): 6867-6875.

**Zhang, J. P.**, J. Yan, J. Xu, X. H. Pang, M. S. Chen, L. Li, C. Wu, S. P. Li and L. Zheng (2009). "Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients." J Hepatol **50**(5): 980-989.

**Zou, W.** (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.

## 9. Összefoglalás

A rosszindulatú daganatok kialakulásához a ma elfogadott modell szerint számos genetikai változás vezet. Ilyen például a növekedési faktoroktól való függetlenedés, a kontakt gátlás megszűnése, a programozott sejthalál hibás működése, a genetikai stabilitás elvesztése, az angiogenezis, az invázió és az áttétképzés. Ezen folyamatok miatt a daganatok előbb-utóbb óhatatlanul az immunrendszer „látókörébe” kerülnek, ezért túlélésükhöz az immunválasz modulálására van szükségük.

A nukleáris faktor-kappaB (NF- $\kappa$ B) jelátviteli út meghatározó szerepet játszik a daganatos megbetegedésekben. Fokozott aktivitása több tumor esetében megfigyelhető, és kapcsolatba hozható a daganatképzés különböző lépéseivel. Kemoterápia hatására tovább emelkedhet az NF- $\kappa$ B aktivitás, ez megvédheti a daganatos sejteket a kemoterápia indukálta sejthaláltól.

A daganatok kialakulásának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni rezisztenciájának fontos komponense a tumor-gazda kommunikáció és a megváltozott tumor mikrokörnyezet. Ennek fontos mediátorai a tumorok által kibocsátott exoszómák. Az exoszómák 20-100 nm átmérőjű mikrovezikulák, melyeket minden emlős sejt képes termelni. Az exoszómák endoszómális eredetűek; exocitózissal kerülnek ki a sejtből. Hatásuk sokféle lehet; a hordozott fehérjék, receptorok, transzkripciós faktorok, mRNS-ek és miRNS-ek révén befolyásolhatják a célsejtek működését. A tumorsejtek által kibocsátott exoszómák immunmoduláló szerepe még nem teljesen tisztázott. A tumor fejlődési stádiumától és az exoszómák típusától függően mind aktiváló, mind gátló hatásokról beszámol a szakirodalom. Az exoszómák által átvitt információ befolyásolja a tumorsejtek migrációját, az antigén-specifikus T sejt választ, megváltoztatja a sejtek polaritását.

A melanoma a melanocitákból kialakuló rosszindulatú, invazív bőrdaganat; mely nagy valószínűséggel képez áttéteket. Genetikai variabilitása még a többi tumorhoz képest is magas, és hatékonyan kerüli el az immunválaszt. Mindezek pontos mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. Egyik lehetőség, hogy a melanoma sejtekben az NF- $\kappa$ B jelátviteli út folyamatosan aktív, melynek hatására anti-apoptotikus, angiogenezisben szerepet játszó és migrációt elősegítő fehérjék termelődnek. Egy másik lehetséges mechanizmus a melanoma sejtek exoszóma termelése. A tumor sejtek által kibocsátott exoszómák megváltoztathatják a tumor mikrokörnyezetében lévő sejtek fenotípusát, így többek között hozzájárulhatnak az immunrendszer felügyeletének elkerüléséhez.

Munkám első részében célunk olyan nem toxikus kis molekulák vizsgálata volt, amelyek képesek az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal gátlásán keresztül a tumor növekedés megakadályozására. Tervünk volt megvizsgálni a vanillin és kilenc rokon analógjának melanoma sejtek NF- $\kappa$ B aktivitására és proliferációjára gyakorolt hatását. Mivel a kemoterápiás kezelések hatására aktiválódott NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal hozzájárulhat a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásához és szerepet játszhat a tumor „escape” mechanizmusokban munkánk két különböző családba tartozó kemoterápiás szer a DNS interkaláló doxorubicin és alkilálók közé tartozó ciklofoszfanid vizsgálatával folytattuk. Megvizsgáltuk, hogy a kemoterápiás szerek és a vanillinek kombinációs kezelése milyen hatással van a melanoma sejtek NF- $\kappa$ B aktivitására és proliferációjára. Ezt követően az *in vitro* eredményeink alapján a leghatásosabbnak talált vanillin analógok további *in vivo* tumor ellenes hatásának vizsgálatát terveztük egér xenograft modellben.

A daganatok kialakulásának, áttétképzésének és kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakításának fontos komponense a tumor-gazda kommunikáció és a megváltozott tumor mikrokörnyezet, amelyeknek fontos mediátorai a tumorok által kibocsátott exoszómák. Munkám második részében célunk az exoszómák által mediált tumor-gazda kommunikáció alaposabb megismerése volt. Ehhez megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a melanoma sejtek által termelt exoszómák a tumorelles immunválasz iniciációjában szerepet játszó immunsejtekre. Munkánk során a széles körben használt B16F1 egér melanomát, mint exoszómát kibocsátó sejtet, és egér dendritikus sejteket, makrofágokat és T sejteket használtunk.

Munkám első részében az A375/NF- $\kappa$ B-Luc.4 (neo) melanoma riporter sejtek aldehyd- és/vagy doxorubicin kezelés hatására adott NF- $\kappa$ B választ és a hatóanyagok sejtproliferációra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A tíz aldehyd közül hat a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehyd, a 2,5-dimetoxi-benzaldehyd, a 2-nitro-benzaldehyd, a 2,4,6-trihidroxibenzaldehyd (TBA), az *ortho*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehyd citosztatikus hatással rendelkeztek. Közülük a leghatásosabban a TBA és az *o*-vanillin gátolta az A375 human melanoma sejtek proliferációját. A doxorubicin koncentráció-függően aktiválta az NF- $\kappa$ B szignáltranszdukciós utat. A doxorubicin kezelés hatására megemelkedett NF- $\kappa$ B választ a 2,4,6-trimetoxi-benzaldehyd, 2,4-dihidroxibenzaldehyd, 2-nitro-benzaldehyd, TBA, *o*-vanillin és 3-quinolin-karboxaldehyd molekulák hatékonyan csökkentették, amelyek közül a legaktívabbnak szintén az *o*-vanillin bizonyult. Az *o*-vanillin nem csak a doxorubicinre

adott NF- $\kappa$ B választ csökkentette, hanem a melanoma sejtek alap (konstitutív) aktivitását egyaránt.

Az *o*-vanillin és TBA NF- $\kappa$ B gátló hatását egy másik családba tartozó kemoterápiás szer, az alkiláló ciklofoszfamid esetében is megvizsgáltuk. A 4-hidroperoxi-ciklofoszfamid, amely a ciklofoszfamid *in vitro* alkalmazható aktív formája, 12,5  $\mu$ M-os koncentrációban 50%-kal növelte a sejtek NF- $\kappa$ B aktivitását, melyet az *o*-vanillin 43%-kal, míg a 2,4,6-trihidroxi-benzaldehid 20%-kal csökkentett.

Az *in vitro* kísérletek alapján legígéretesebbnek talált *o*-vanillint és TBA-t választottuk *in vivo* xenograft kísérleteinkhez. Klinikai modellt felállítva A375 humán melanomával oltottunk NSG immundeficiens egereket, majd megvizsgáltuk külön az aldehidek és ciklofoszfamiddal együtt adjuváns terápiaként a primér tumorra gyakorolt hatásukat. Az ciklofoszfamid és *o*-vanillin adjuváns terápia már a tumor beadásától számított 15. napon szignifikánsan csökkentette a primér tumor növekedését, amely szignifikancia a kísérlet végéig megmaradt. Az *o*-vanillin monoterápia a 20. napon eredményezett szignifikáns primér tumor csökkenést. A TBA ciklofoszfamiddal kombinált terápiaként volt hatékony a tumor beadását követő 20 napon, míg monoterápiaként a 15. és 20. napon gátolta jelentős mértékben a primér tumor növekedését. A ciklofoszfamid kezelés csak a 20. napra fejtette ki szignifikáns tumor növekedést gátló hatását.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy mind az *o*-vanillin, mind a TBA tumorelles hatással rendelkezik *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt.

Munkám második részében az exoszómák immunoduláló hatásának vizsgálatára az elterjedten használt B16F1 egér melanoma sejtvonalat választottuk. Első lépésként beállítottunk egy sztenderd protokollt az exoszómák *in vitro* termeltetésére és izolálására, melyet többszöri differenciál szűrést követően ultracentrifugálással valósítottunk meg. Az exoszóma preparátumok azonosítását és validálását atomi erő mikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével végeztük. Az irodalmi adatoknak megfelelő eredményt kaptunk, az általunk tisztított exoszómák 20-100 nm-es mérettartományba esnek, és hogy nem mutatnak belső struktúráltságok, amely kizárja a vírusrészecskékkel való esetleges szennyezettséget. Ezt követően kimutattuk, hogy a melanoma sejtekből származó exoszómák elősegítik a dendritikus sejtek funkcionális érését, amelyet a dendritikus sejtek hatására indukált T sejt proliferáció mutatott. Az általunk kapott eredmények ellentmondanak pár korábban megjelent tanulmánynak, amelyekben arról számolnak be, hogy az exoszómák megakadályozzák a dendritikus sejtek érését, így képtelenek fokozni a

tumor ellenes immunitást (Yu, Liu et al. 2007). Vannak olyan tanulmányok is, amelyek arról számolnak be, hogy az exoszómák fokozzák a tumor ellenes immunitást. A tumor sejtek által termelt exoszómák tumor antigéneket hordozva aktiválják a dendritikus sejteket, amelyek antigén specifikus citotoxikus T sejt mediálta tumor ellenes hatást váltanak ki (Yang and Robbins 2011). Multhoff és munkatársai bizonyították, hogy a Hsp70/Bag-4 membrán pozitív hasnyálmirigy és vastagbél daganat sejtekből származó exoszómák fokozzák az NK sejtek migrációját és citotoxikus aktivitását (Gastpar, Gehrmann et al. 2005). Kísérleteink során az exoszóma kezelés hatására aktiválódott az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal. A makrofágokban aktivált NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal összefüggésbe hozható olyan gének expressziójával (VEGF, IL-6, TNF- $\alpha$ ), amelye szerepet játszanak a tumorigenezisben, rávilágítva a makrofágok tumorigenezisben betöltött szerepére. Mindezen adatok azt sugallják, hogy az exoszóma által indukált NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a rosszindulatú folyamatok kialakulásában.

Az exoszóma kezelés hatására megváltozott citokin- és kemokin profil a makrofágok alternatív aktivációját sugallja. Az exoszóma indukció a M1 és M2 citokin- és kemokin profiltól egyaránt eltérő, alternatív mintázatot mutatott. A TIMP1 mátrix metalloproteináz inhibitor szintjének csökkenése összefüggésbe hozható a metasztázisképzéssel. A csökkent tumorelles M1-es immunválaszt tükrözheti az INF $\gamma$  és IL-16 szintjének csökkenése és az IL-1RA és az IL13 szintjének emelkedése. Ezek jól ismert gátlói az 1-es típusú immunválasznak. A TIMP1 hatása kétirányú lehet a tumoros folyamatokban. A mátrix metalloproteinázok gátlásán keresztül megakadályozhatja a tumorok invázióját és metasztázis képzését, míg mátrix metalloproteináz-független aktivitása révén hozzájárulhat a tumoros folyamatok elősegítéséhez. Ilyen például a mitogén- és az anti-apoptotikus hatás. A CCL2, IL-8 és MIP-1, amelyek a kísérleteink során magas szinten expresszáldódtak, összefüggésbe hozhatók a gyulladásos folyamatokkal, az angiogenezissel, tumorigenezissel és a sebgyógyulási folyamatokkal. A MIP-2 és IL8 (CXCL8) kemokinek megnövekedett szintje a melanoma sejtekben konstitutívan aktív NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal hatásának tulajdonítják. Mivel azonban olyan kifejezetten anti-tumorális hatású citokin, mint a TNF- $\alpha$  is jelen volt a kísérletes rendszerben, egyértelmű tumortámogató profil felállítása nem lehetséges.

Exoszómákra irányuló vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a B16F1 sejtek által termelt exoszómák hatással vannak az immunrendszer sejtjeire. *In vitro* körülmények között az exoszómák megváltoztatják a dendritikus sejtek és makrofágok funkcióját; T sejt proliferációt és NF- $\kappa$ B aktivációt idéznek elő. A melanoma sejtek által termelt exoszómák

hatására a makrofágok citokin és kemokin profilja is megváltozik. Az exoszóma kezelés hatására tumort támogató, és tumoros folyamatokat gátló citokinek és kemokinek is kimutathatóak voltak.

Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy a tumor sejtek által kibocsátott exoszómák immunológiai szempontból aktív résztvevői a daganatos folyamatoknak. A daganatok környezetében, sok tényező miatt, eleve a kettes típusú polarizáltság jellemző. Bár esetünkben, *in vitro* környezetben, kettős arcot mutat az exoszómával kezelt makrofágok citokin és kemokin profilja, az exoszómák a daganatos környezetben nagy valószínűséggel ezt a kettes típusú, vagyis tumortámogató környezetet erősítik. Kijelenthetjük tehát, hogy az exoszómák daganatos mikrokörnyezet többi elemével szorosan kölcsönhatva, aktív szereplőként vesznek részt a tumorok fejlődésének különböző szakaszaiban.

## **Következtetések**

A vizsgált aldehidek közül a természetben is előforduló *o*-vanillin és a TBA hatásosan gátolták az A375 humán melanomasejtek proliferációját. Az aldehidek egyaránt csökkentették a melanoma sejtek alap- és a citosztatikum kezelés hatására megemelkedett NF- $\kappa$ B választ. Az *in vivo* kísérletek során az A375 humán melanoma sejtekkel oltott NSG egerek primér tumor növekedését is szignifikánsan gátolta a TBA és az *o*-vanillin, ciklofoszfamiddal kombinációs terápia és monoterápiaként egyaránt. Eredményeink alapján elképzelhető, hogy a vizsgált aldehidek vagy további analógjaik citosztatikum-kezelés adjuvánsaként alkalmazhatóak.

A melanóma sejtekből származó exoszómák segítik a dendritikus sejtek érését, ezáltal megnövekedett T sejt proliferációt váltanak ki. Képesek aktiválni a makrofágokat, ami NF-  $\kappa$ B aktivációval jár. Az exoszómával kezelt makrofágok citokin/kemokin mintázata határozott immunológiai aktivitást mutat és egyaránt eltér a lipopoliszachariddal és interleukin-4-gyel kezelt sejtek mintázatától. Az melanoma sejtek által termelt exoszómák komplex és egyedi immunmoduláló hatással rendelkeznek. Eredményeink alapján diagnosztikai markerként vagy terápiás célpontként is javasolhatóak.

## 10. Summary

According to the accepted model, many genetic changes are necessary to the malignant tumor formation. These genetic changes make tumor cells independent from growth factors, contact inhibition disappears, errors occur in programmed cell death, genetic stability is lost, resulting in a malignant phenotype characterized by angiogenesis, invasion and metastasis formation. Due to these genetic alterations, tumors will sooner or later be detectable by the immune system; therefore they have to modulate the immune system to survive.

The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling pathway plays a crucial role in cancer. Increased activity of the transcription factor was documented in many tumor types, which was related to different steps of tumorigenesis. The chemotherapeutic drugs can further increase the NF- $\kappa$ B activity that, in turn, can protect tumor cells from chemotherapy-induced cell death.

The tumor-host communication and the altered tumor microenvironment are crucial components of the tumor development, metastasis formation and chemotherapy resistance. Tumor-derived exosomes are essential mediators of this communication. Exosomes are microvesicles of 20-100 nm diameter. They can be produced by each mammalian cell types. The exosomes have endosomal origin, and they are released from the cells by exocytosis. Exosomes have diverse activities; they can influence the target cells by their protein, cell surface receptor, transcription factor, mRNA and miRNA content. The role of immune modulation exerted by tumor-derived exosome in tumorigenesis is still not completely clear. Activating and inhibitory effects have likewise been revealed, depending on the tumor developmental stage and the type of exosomes. The information that exosomes are carrying influences the migration of tumor cells, the antigen-specific T cell response and the polarity of the immune response.

The melanoma, a tumor that derives from melanocytes, is a malignant and invasive skin cancer. Melanoma forms metastases by high probability. Its genetic variability is higher than most other tumors, and it effectively avoids immune surveillance. The exact mechanism of this immune escape is unclear. One mechanism might be the constitutive NF- $\kappa$ B activation leading to induction of anti-apoptotic, pro-angiogenic and metastasis promoting proteins. Exosomes produced by the tumor might also be involved in the process. The tumor derived exosomes can alter the tumor stroma, which can contribute to avoiding immune surveillance. Importantly, the chemotherapy induced NF- $\kappa$ B activity increase can further enhance exosome release.



In the first part of the study we investigated the impact of vanillin and/or doxorubicin on cell proliferation and NF- $\kappa$ B signaling using the A375/NF- $\kappa$ B.Luc.4 (neo) reporter cell line. Six of the ten tested aldehydes had cytotoxic effect: 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyde, 2,5-Dimethoxybenzaldehyde, 2-Nitrobenzaldehyde, 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde (TBA), *ortho*-Vanillin, 3-Quinolinecarboxaldehyde. TBA and *o*-vanillin were the most active. Doxorubicin activated the NF- $\kappa$ B signal pathway of the A375 cells. This activity was reduced by 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyde, 2,4-Dihydroxybenzaldehyde, 2-Nitrobenzaldehyde, *ortho*-Vanillin, TBA and 3-Quinolinecarboxaldehyde treatment. *o*-Vanillin appeared to be the most active. *o*-Vanillin reduced the doxorubicin induced NF- $\kappa$ B activity and the basal (constitutive) activity of the melanoma cells as well.

Then we examined the inhibitory effect of *o*-vanillin and TBA on NF- $\kappa$ B activity induced by another chemotherapeutic agent, the alkylating compound cyclophosphamide. 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC), a bioactive derivative of cyclophosphamide, used at 12.5  $\mu$ M concentration, increased the NF- $\kappa$ B activity by 50%. *o*-Vanillin was suppressed this increased activity by 43%, while TBA by 20%.

Based on the *in vitro* findings, *o*-vanillin and TBA were selected for *in vivo* efficacy test in A375 human melanoma-bearing NSG mice, as a single agent and in combination with cyclophosphamide. The growth inhibition of the *o*-vanillin/cyclophosphamide combination reached statistical significance by day 15, and remained statistically significant until the end of the experiment (*i.e.* day 20). Moreover, on day 20, the antitumor effect of both tested aldehydes, as single agents, was significant.

With these experiments we showed that the *o*-vanillin and TBA have anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo* as well.

In the second part of the work, we were investigated the immunomodulatory effect of exosomes in the well known B16F1 mouse melanoma model. After multiple differential filtrations the exosomes were isolated with ultracentrifugation. Size and form distribution of exosomes was determined by atomic force microscopy. Our results were in accordance with data from the literature, as we purified exosomes in the range of 20-100 nm in diameter. Transmission electron microscopy showed that they had no internal structure, excluding viral contamination.

Then we showed that melanoma cell derived exosomes promoted the maturation of dendritic cells, as the treated dendritic cells induced more intensive T cell proliferation in a co-culture system. These results are in contrast with several earlier papers suggesting that

exosomes suppress, rather than promote dendritic cell maturation, therefore they might not enhance anticancer immunity. On the other hand, there are publications that report that exosomes might induce anti-tumor immunity. In some models, tumor cell derived exosomes carrying tumor antigens can activate the dendritic cells that, in turn, activate antigen specific cytotoxic T cell response. For example, exosomes originating from Hsp70/Bag-4 membrane-positive pancreas- and colon tumor cells stimulate migration and reactivity of NK cells. In our experiments, exosomes induced NF- $\kappa$ B activation in macrophages.

The cytokine and chemokine expression changes induced by the exosomes reflect an alternatively activated macrophage profile. The exosome induction resulted in a cytokine and chemokine profile different both from the M1 and the M2 profiles. The reduced level of TIMP1 matrix metalloproteinase inhibitor might be involved in metastasis formation. The decreased level of IFN $\gamma$  and IL-16 might reflect a reduced anti-tumor M1 response, together with the increased level of IL-1Ra and IL-13, both well known suppressors of the type 1 immune response. CCL2, IL-8 and MIP-1 were expressed in high levels in our model. They have been shown to be involved in inflammation, angiogenesis, and tumorigenesis and wound healing. The elevated level of MIP-1 and IL-8 is correlated with the constitutive activation of the NF- $\kappa$ B in melanoma cells. Because TNF- $\alpha$  and other anti-tumor cytokines were also present in our experiments, we cannot set up a clearly defined tumor supporting profile either.

Taken together, B16F1 melanoma cell derived exosomes can influence the immune response. In *in vitro* conditions the exosomes alter dendritic cell and macrophage function, induce T cell proliferation and NF- $\kappa$ B activation. The exosome treatment changes the cytokine and chemokine profile of the macrophages, resulting in the expression of both tumor promoting and anti-tumor cytokines and chemokines.

The conclusion of our observations is that exosomes are immunologically active participants of the tumor-host communication. Due to numerous factors, tumor microenvironment is characterized by type 2 immune polarization. In our *in vitro* experiments, the exosome-treated macrophages show a „mixed” polarization profile, in the tumor microenvironment, exosomes are likely to enhance the existing type 2 polarization. In summary, interacting with other elements of the tumors microenvironment, exosomes play an important role in tumorigenesis.

## **Conclusion and final remarks**

From the tested aldehydes, *ortho*-vanillin and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde significantly reduced melanoma cell growth. The selected vanillins reduced the basal- and chemotherapy induced NF- $\kappa$ B activity of melanoma cells as well. In an *in vivo* mouse xenograft model, *ortho*-vanillin and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde inhibited primary tumor growth as monotherapy, or in combination with cyclophosphamide. According to our results, these aldehydes might be considered for use as adjuvant therapy in melanoma.

Melanoma cell derived exosomes promoted the maturation of dendritic cells, resulting in enhanced dendritic cell-induced T cell proliferation. The exosomes induced macrophage activation, and altered the macrophage cytokine and chemokine profile that was different from both the LPS and the IL-4 induced profiles. Since the melanoma cell derived exosomes have a unique and complex immunomodulatory effect. Based on our results, they might be considered as diagnostic markers and therapeutic targets.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek **Dr. Vizler Csabának** és **Dr. Buzás Krisztinának** a kezdetektől nyújtott támogatásukért, nélkülözhetetlen tanácsaikért. Köszönöm a lehetőséget, a rengeteg szakmai beszélgetést, a türelmet és bizalmat.

Köszönöm **Prof. Duda Ernőnek** a támogatását, hasznos tanácsait.

Nagyon hálás vagyok **Kúsz Erzsébetnek**, hogy bevezetett a szövettenyésztés rejtelmeibe, hogy hosszú éveken át odaadóan tanított és hasznos tanácsokkal látott el. Köszönöm, hogy mind szakmai, mind baráti támogatásával mellettem állt.

Köszönettel tartozom megannyi SZBK-s kollégámnak, jelenlegi és volt csoporttagoknak, hogy segítették munkám, hogy mosolyukkal és beszélgetéseikkel boldogabbá tették hétköznapijaimat. Külön köszönetet szeretnék mondani **Dr. Tubak Vilmosnak** és **Jósvay Katalinnak**, hogy mindig fordulhattam hozzájuk segítségért. Hálás vagyok a szakmai tanácsaikért, biztatásukért és baráti támogatásukért!

Köszönettel tartozom **Luigi Quintieri-nek**, a munkám során és a cikk megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönöm **Katona Róbertnek**, hogy lehetőséget biztosított az NSG egérkísérletek kivitelezéséhez.

Köszönöm opponenseimnek **Dr. Czibula Ágnesnek** és **Dr. Varga Csabának**, hogy rövid határidővel elvállalták dolgozatom bírálatát. Köszönöm a sok hasznos észrevételt és tanácsot.

Köszönöm **Dr. Szegletes Zsoltnak** és **Dr. Siklós Lászlónak** az exoszómákról készített felvételeket.

Nagyon hálás vagyok **barátaimnak**, hogy mellettem álltak, hittek bennem és biztattak. Külön köszönöm **Hudoba Lizának**, aki „3 in 1” mint a kollégám, a barátom és az edzőm mindig és mindenben támogatott. Hálás vagyok **Buhala Andreának** a türelméért, a támogatásáért, hogy rendíthetetlenül kitartott mellettem. Köszönöm a barátságukat!

Köszönettel tartozom a **családomnak** és **rokonaimnak**, hogy mindvégig hittek bennem és mindenben támogattak. Hálás vagyok az **édesanyámnak**, **édesapámnak**, **testvéremnek**, **sógoromnak**, hogy szeretetükre mindig számíthattam és **unokaöcsémnek**, hogy beragyogta napjaimat.

*U.i.: „Crescit sub pondere palma!”*

Dolgozatom megvalósításához hozzájárult a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP), melynek címe: "Molekuláris biológiai kutatóműhely az egészség- és környezetvédelem szolgálatában: Társadalmi igényt kielégítő kutatások a kiválósági centrum nemzetközi versenyképességének fokozására" (azonosító: **GINOP-2.3.2-15-2016-00001**).

## 12. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10032800

### Tézis alapjául szolgáló közlemények

**Marton A**, Kúsz E, Kolozsi C, Tubak V, Zagotto G, Buzás K, Quintieri L, Vizler C. Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NF $\kappa$ B Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma. *Anticancer Res, in press* IF=1,826

**Marton A**, Vizler C, Kusz E, Temesfoi V, Szathmary Z, Nagy K, Szegletes Z, Varo G, Siklos L, Katona RL, Tubak V, Howard OM, Duda E, Minarovits J, Nagy K, Buzas K. Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell functions in vitro. *Immunol Lett.* 2012 Nov-Dec;148(1):34-8. IF: 2,337

### További közlemények

Pérez-García LA, Csonka K, Flores-Carreón A, Estrada E, Mellado-Mojica E, Németh T, López-Ramírez LA, Toth R, López MG, Vizler C, **Marton A**, Toth A, Nosanchuk JD, Gacser A, Mora Montes HM. Role of Protein Glycosylation in Candida parapsilosis Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Frontiers in Microbiology* 2016 Mar 8;7:306. IF=4,165

Hackler L Jr, Ózsvári B, Gyuris M, Sipos P, Fábián G, Molnár E, **Marton A**, Faragó N, Mihály J, Nagy LI, Szénási T, Diron A, Párducz Á, Kanizsai I, Puskás LG. The Curcumin Analog C-150, Influencing NF- $\kappa$ B, UPR and Akt/Notch Pathways Has Potent Anticancer Activity In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2016 Mar 4;11(3):e0149832. IF=3.057

Schäfer B, Orbán E, Fiser G, **Marton A**, Vizler C, Tömböly C. Semisynthesis of membrane-anchored cholesteryl lipoproteins on live cell surface by azide–alkyne click reaction, *Tetrahedron Letters* 2016; 57: 868-873. IF=2,379

Buzas K<sup>#</sup>, **Marton A**<sup>#</sup>, Vizler C, Gyukity-Sebestyen E, Harmati M, Nagy K, Zvara A, Katona R, Tubak V, Endresz V, Nemeth I, Olah J, Vigh L, Biro T, Kemeny L. Bacterial sepsis increases survival in metastatic melanoma: Chlamydia pneumoniae induces macrophage polarization and tumor regression. *Invest. Dermatol.* 2016 Apr;136(4):862-5.  
<sup>#</sup> megosztott első szerző. IF=7.216

Manczinger M, Bocsik A, Kocsis GF, Vörös A, Hegedűs Z, Ördögh L, Kondorosi É, **Marton A**, Vizler C, Tubak V, Deli M, Kemény L, Nagy I, Lakatos L The absence of N-acetyl-D-glucosamine causes attenuation of virulence of *Candida albicans* upon interaction with vaginal epithelial cells in vitro. *Biomed Res Int* 2015;2015:398045. IF=2,134

Virágh M, **Marton A**, Vizler C, Tóth L, Vágvölgyi Cs, Marx F, Galgóczy L Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein. *Protein and Cell* 2015;6:(7) pp. 518-528. IF=3,817

Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, Sántha M, Molnár M, Tuka B, Klivényi P, Vécsei L, **Marton A**, Vizler C, Oláh M, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E. Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic-like behavior via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors in a cannabinoid receptor independent manner. *Neuropharmacology*, 2014 Oct 16;89C:298-307. IF=5,106

Jósvay K, Winter Z, Katona RL, Pecze L, **Marton A**, Buhala A, Szakonyi G, Oláh Z, Vizler C. Besides neuro-imaging, the Thy1-YFP mouse could serve for visualizing experimental tumours, inflammation and wound-healing. *Scientific Reports*, 2014 Oct 27;4:6776. IF=5,578

**Marton A**, Kolozsi C, Kusz E, Olah Z, Letoha T, Vizler C, Pecze L. Propylene-Glycol Aggravates LPS-Induced Sepsis through Production of TNF- $\alpha$  and IL-6. *Iran J Immunol*. 2014 ;11(2):113-22.

Nagy LI, Molnár E, Kanizsai I, Madácsi R, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábián G, **Marton A**, Vizler C, Ayaydin F, Kitajka K, Hackler L Jr, Mátés L, Deák F, Kiss I, Puskás LG. Lipid Droplet Binding Thalidomide Analogs Activate Endoplasmic Reticulum Stress and Suppress Hepatocellular Carcinoma in a Chemically Induced Transgenic Mouse Model. *Lipids Health Dis*. 2013 Nov 22;12(1):175. IF=2,31

Összesített IF: 39,925